

Université de Montréal

Rôle des facteurs de virulence des *Escherichia coli* pathogènes  
aviaires dans la colibacillose

Par

Melha Mellata

Département de pathologie et microbiologie  
Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D.)  
en sciences vétérinaires  
option microbiologie

Octobre 2003

©Melha Mellata, 2003



SF

607

U54

2004

v.009

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Rôle des facteurs de virulence des *Escherichia coli* pathogènes aviaires  
dans la colibacillose

Présentée par :

Melha Mellata

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Mario Jacques

Président-rapporteur

Dr John M. Fairbrother

Directeur de recherche

Dr Sylvain Quessy

Membre du Jury

Dr Albert Descoteaux

Examineur externe

Dr Serge Messier

Représentant du doyen de la FES

A decorative rectangular border with a repeating pattern of small, stylized floral or geometric motifs, enclosing the central text.

# SOMMAIRE

La colibacillose est responsable de pertes économiques importantes dans les élevages avicoles. Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) sont les agents étiologiques de cette infection qui souvent est respiratoire. Les facteurs de virulence associés aux APEC sont les fimbriae de type 1 et P, le curli, une hémagglutinine (Tsh), l'aérobactine, la capsule K1, les plasmides ColV et d'autres facteurs non encore caractérisés (exemple la région 0-min du chromosome). Le rôle des différents facteurs dans la pathogénie de la colibacillose n'est pas clairement établi.

Nous avons évalué le rôle des facteurs de virulence dans la résistance au sérum et la pathogénicité chez le poulet, dans l'interaction avec les phagocytes et la réponse immunitaire innée en utilisant des mutants isogéniques de différents facteurs de virulence de trois souches APEC TK3, MT78 et  $\chi$ 7122 appartenant respectivement aux sérotypes O1, O2, et O78. Nos résultats montrent une corrélation entre la résistance au sérum et la virulence des souches. Les facteurs de virulence impliqués dans la résistance au sérum et la colonisation des organes internes étaient le LPS-O78 chez la souche  $\chi$ 7122 et la capsule K1 chez MT78. Par contre le curli et les fimbriae de type 1 et P ne semblent pas contribuer à la résistance au sérum. Nous avons montré que le gène *iss* est sur le plasmide pAPEC-1 chez la souche  $\chi$ 7122 et qu'il ne semble pas jouer un rôle majeur dans la résistance au sérum.

L'interaction des bactéries avec les phagocytes a été évaluée sur des cultures primaires d'hétérophiles et de macrophages. Nos résultats ont confirmé qu'en plus de promouvoir l'association aux phagocytes, le fimbriae de type 1 protégeait les

bactéries des effets létaux des phagocytes, du moins des hétérophiles. La capsule K1, le LPS-O78, le fimbriae P et la région 0-min permettent aux bactéries d'échapper à la phagocytose. De plus le LPS-O78, le fimbriae P et la région 0-min protégeaient les bactéries associées de l'effet bactéricide des phagocytes.

Nous avons évalué la réponse de l'hôte à l'infection par les APEC *in vitro* en mesurant la production de l'oxyde nitrique (NO) et la réponse oxydative dans les macrophages et le sang respectivement, et l'induction des cytokines inflammatoires dans les macrophages. L'activation des cellules sanguines et des macrophages était beaucoup plus élevée avec les bactéries non-opsonisées qu'avec les opsonisées. Un taux élevé de NO a été produit par les macrophages infectés avec la souche non-pathogène, le mutant K1, ou le mutant O78<sup>-</sup>. La réponse oxydative des macrophages était plus élevée avec les mutants O78 et P qu'avec les autres souches. Les profils des cytokines induites dépendaient des souches et de leur état d'opsonisation. Nos résultats suggèrent que la présence de certains facteurs de virulence module la réponse immunitaire innée qui est très importante dans les premières étapes de l'infection des APEC. Une meilleure connaissance des mécanismes de pathogénicité et de la réponse immunitaire aux infections pourrait aider à établir une approche plus efficace dans le traitement et la prévention de la colibacillose chez les poulets.

**Mots clés :** *Escherichia coli*, poulet, virulence, résistance au sérum, pathogénicité, hétérophiles, macrophages, oxyde nitrique, réponse oxydative, cytokines.



## **SUMMARY**



Avian colibacillosis is caused by avian pathogenic *E. coli* (APEC) via respiratory tract infection. Many virulence factors, including type 1 and P fimbriae, curli, aerobactin, K1 capsule, and temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh), plasmid DNA regions, and an uncharacterized pathogen-specific chromosomal region (0-min region) have been associated with APEC. The role of these virulence factors in colibacillosis has not well elucidated. By using mutants of APEC strains TK3, MT78, and  $\chi$ 7122, which belong to serogroups O1, O2, and O78 respectively, we investigated the role of virulence factors in resistance to serum and pathogenicity in chickens, their interaction with phagocytes, and their role in innate immune response. Virulence factors that increased bacterial resistance to serum and colonization of internal organs of infected chickens were O78-LPS of *E. coli*  $\chi$ 7122, and the K1 capsule of *E. coli* MT78. In contrast, curli, type 1, and P fimbriae did not appear to contribute to serum-resistance. We also showed that the *iss* gene is located on plasmid pAPEC-1 of *E. coli*  $\chi$ 7122 but does not play a major role in resistance to serum for strain  $\chi$ 7122.

Bacteria-host cell interaction was tested with chicken heterophils and macrophages. Our results confirm the important role of type 1 fimbriae in promotion of initial phagocytosis, but nevertheless indicate a role for type 1 fimbriae in the protection of bacteria from subsequent killing, at least in heterophils. Results also indicate a role for K1 capsule, O78 LPS, P fimbriae, and the 0-min region in initial avoidance of phagocytosis, but demonstrate an additional role for O78, P fimbriae,

and the 0-min region in subsequent protection against the bactericidal effects of phagocytes after bacterial association has occurred.

We have examined the host response to APEC infection by determining *in vitro* the production of nitric oxide (NO) and oxidative burst in macrophages and in fresh blood respectively, and the induction of inflammatory cytokines in macrophages. Non-opsonized bacteria generally activated blood cells and macrophages to a greater extent than opsonized bacteria. A higher level of NO was produced by macrophages infected with a non-pathogenic strain, a K1 mutant, or rough mutant (O78<sup>-</sup>). The oxidative burst was higher in macrophages infected with the O78 and P fimbriae mutants than in macrophages infected with the other strains. The induction of some cytokines depended on the strain and its opsonization state. We demonstrated that APEC strains activated chicken phagocytes to a lesser extent than a non-pathogenic strain, and that the presence of K1 capsule and P fimbriae in APEC resulted in a decrease in phagocyte activity. Hence, our results suggest that the non-specific host immune response would be important in the initial steps of APEC infection and that certain bacterial virulence factors modulate this response. A better understanding of the mechanisms of pathogenesis and the immune response to APEC infection could lead to a more efficacious approach for the treatment and prevention of colibacillosis in chickens.

**Keywords:** *Escherichia coli*, chicken, virulence, serum resistance, pathogenicity, heterophils, macrophages, nitric oxide, oxidative response, cytokines.

## TABLE DE MATIÈRES

IDENTIFICATION DU JURY.....	ii
SOMMAIRE.....	iii
SUMMARY.....	vi
TABLE DE MATIÈRES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES FIGURES.....	xiv
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xvi
DÉDICACE.....	xviii
REMERCIEMENTS.....	xix
I. INTRODUCTION.....	1
II. REVUE DE LA LITTÉRATURE.....	8
1. Les différents groupes des <i>Escherichia coli</i> pathogènes .....	9
1. 1. Généralités.....	9
1. 2. Les <i>E. coli</i> à tropisme intestinal.....	11
1. 2. 1. Les <i>E. coli</i> entérotoxigènes (ETEC).....	11
1. 2. 2. Les <i>E. coli</i> entérotoxigènes (EPEC).....	12
1. 2. 3. Les <i>E. coli</i> entérohémorragiques (EHEC).....	13
1. 2. 4. Autres <i>E. coli</i> entérotoxigènes .....	14
1. 3. Les <i>E. coli</i> à tropisme extra-intestinal.....	15
2. Les <i>E. coli</i> pathogènes aviaires (APEC).....	17
2. 1. Les facteurs de virulence associés aux APEC.....	19

2. 1. 1. Le sérotype.....	20
2. 1. 2. Les OMPs Iss et TraT.....	20
2. 1. 3. Fimbriae de type I.....	22
2. 1. 4. Fimbriae de type P.....	27
2. 1. 5. Le curli.....	30
2. 1. 6. Hémagglutinine sensible à la température (Tsh).....	32
2. 1. 7. Les capsules.....	34
2. 1. 8. Systèmes d'acquisition du fer.....	39
2. 1. 9. Les toxines.....	40
2. 2. Relation génétique entre les souches APEC.....	41
2. 3. Pathologies associées aux APEC.....	42
2. 3. 1. Complexe respiratoire chronique et septicémie.....	42
2. 3. 2. Infection du tractus génital (ovarites et salpingites).....	44
2. 3. 3. Mortalité des embryons et du jeune poussin.....	44
2. 3. 4. La cellulite (ou dermatite nécrotique).....	45
2. 3. 5. Autres maladies associées aux APEC.....	46
2. 4. Modèles expérimentaux utilisés pour étudier le pouvoir pathogènes des APEC.....	47
3. Particularités du système de défense des oiseaux.....	48
3. 1. Les éléments essentiels du système de défense inné des oiseaux.....	49
3. 1. 1. Particularités de l'appareil respiratoire des oiseaux.....	50
3. 1. 2. Système du complément .....	51
3. 1. 3. Les phagocytes professionnels des oiseaux.....	56

3. 1. 3. 1. Hétérophiles.....	57
3. 1. 3. 2. Macrophages.....	58
3. 1. 3. 2. 1. Système de défense oxygène-indépendant...	59
3. 1. 3. 2. 2. Système de défense oxygène-dépendant.....	61
3. 1. 3.3 Impact génétique sur la résistance des phagocytes....	63
3. 1. 3. 3. 1. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH).....	63
3. 1. 3. 3. 2. Les protéines Nramp-1.....	66
3. 1. 3. 3. 3. Les TLRs (Toll-like receptors).....	66
3. 1. 4. Cytokines.....	68
3. 1. 4. 1. Cytokines proinflammatoires.....	76
3. 2. Le processus inflammatoire chez les oiseaux.....	77
<b>III. Matériels, méthodes et résultats.....</b>	<b>80</b>
<b>Article 1 : Melha Mellata, Maryvonne Dho-Moulin, Charles M. Dozois, Roy Curtiss III, Peter K. Brown, Pascal Arné, Annie Brée, Clarisse Desautels, and John M. Fairbrother. 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> to serum and in pathogenicity. Infect. Immun. 71 (1) : 536-40.....</b>	<b>81</b>
<b>Article 2 : Melha Mellata, Maryvonne Dho-Moulin, Charles M. Dozois, Roy Curtiss III, Brigitte Lehoux, and John M. Fairbrother. 2003. Role of avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. Infect. Immun. 71 (2) : 494-503.....</b>	<b>108</b>
<b>Article 3 : Melha Mellata and John M. Fairbrother. 2003. Non-specific</b>	

macrophage response to avian pathogenic <i>E. coli</i> infection <i>in vitro</i> and the role of bacterial virulence factors. (en préparation pour Infect. Immun.).....	155
<b>IV. DISCUSSION</b> .....	194
<b>V. CONCLUSION</b> .....	218
<b>VI. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	224
<b>VII. ANNEXE A. Composition chimique des différents sérotypes de <i>E. coli</i>.</b>	268

## LISTE DES TABLEAUX

### **Revue de la littérature**

<b>Tableau 1.</b> Les capsules des <i>Escherichia coli</i> .....	35
<b>Tableau 2.</b> Les gènes des cytokines clonés des différentes espèces aviaires.....	73

### **Article 1 :**

<b>Table 1.</b> Bacterial strains used in this study.....	102
<b>Table 2.</b> Abilities of APEC strains and various mutants to colonize respiratory organs, invade internal organs, and dissemination in body fluids.....	104
<b>Table 3.</b> Production of inflammatory lesions in air sacs and extrapulmonary organs of chicken inoculated with APEC strains and various mutants.....	105

### **Article 2 :**

<b>Table 1.</b> Bacterial strains used in this study.....	147
<b>Table 2.</b> Resistance of opsonized APEC to killing by phagocytes at 1 h of contact determined by Live/Dead test.....	149

### **Article 3 :**

<b>Table 1.</b> Bacterial strains used in this study.....	188
<b>Table 2.</b> Primers used for RT-PCR analysis of macrophage chicken mRNAs.....	189

## LISTE DES FIGURES

### Revue de la littérature

<b>Figure 1.</b> Mécanismes de régulation de l'expression du fimbriae de type1.....	24
<b>Figure 2.</b> Les voies principales d'activation du complément.....	52
<b>Figure 3.</b> Synthèse de l'oxyde nitrique (NO) dans le macrophage activé.....	60
<b>Figure 4.</b> Étapes de la phagocytose et résumé du mécanisme bactéricide oxygène dépendant dans la vacuole phagocytaire.....	62
<b>Figure 5.</b> Comparaison entre les structures des gènes de IL-1 $\beta$ et de IL-6 aviaires avec celles des gènes de IL-1 $\beta$ et de IL-6 des mammifères.....	74

### Article 1.

<b>FIG. 1.</b> Effect of 90% normal chicken serum on survival of strain.....	106
--	-----

### Article 2.

<b>FIG. 1.</b> Association of opsonized and non-opsonized APEC with heterophils and macrophages.....	151
<b>FIG. 2.</b> Representative photos demonstrating the association and viability of APEC strains and their respective mutants.....	152
<b>FIG. 3.</b> Persistence of opsonized (O) and non-opsonized (NO) APEC in macrophages (gentamicin test).....	153



**Article 3.**

- FIG. 1.** Nitric oxide induction by different strains opsonized or not in macrophages at 3 hours postinfection..... 190
- FIG. 2.** Oxidative burst measured by NBT induced by different strains opsonized or not in macrophages at 1 hour postinfection..... 191
- FIG. 3.** Respiratory burst response in blood cells measured by chemiluminescence with lucigenin..... 192
- FIG. 4.** Profiles of cytokine induction in macrophages infected 1 hour with different strains opsonized (A) or not (B), measured by RT-PCR..... 193

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

AEEC	: Attaching effacing <i>Escherichia coli</i>
APEC	: Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i>
CFA	: Colonization factor antigen
CNF	: Cytotoxic necrotising factor
ColV	: Colicine V
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EAEC	: <i>Escherichia coli</i> entéroadhérentes
EHEC	: Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>
EIEC	: Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i>
ELISA	: Enzyme linked immunosorbent assay
EPEC	: Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i>
ETEC	: Enterotoxinogenic <i>Escherichia coli</i>
ExPEC	: Extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i>
Gal-Gal	: Galactose $\alpha$ (1-4) $\beta$ galactose
HBSS	: Hanks' balanced salt solution
IL	: Interleukin
iNOS	: Inducible nitric oxide synthase
Iss	: Increased serum survival
kDa	: Kilodalton
KDO	: Keto deoxyoctonate
LPS	: Lipopolysaccharide
LT	: Heat-labile toxin
MIP	: Macrophage inflammatory protein
MPO	: Myeloperoxidase
MIP	: Macrophage inflammatory protein
NBT	: Nitroblue tetrazolium
OMP	: Outer membrane protein
Pap	: Pyelonephritis associated pili

PBS	: Phosphate buffered saline
PCR	: Polymerase chain reaction
PMNs	: Polymorphonuclear
Prs	: Pap related sequences
RLU	: Relative light units
ST	: Heat-stable toxin
TLR	: Toll-Like receptor
TNF	: Tumor necrosis factor
Tsh	: Temperature-sensitive hemagglutinin

*À mon défunt père*  
*À toute ma famille*

## REMERCIEMENTS

Je tiens à exprimer ma profonde reconnaissance au Dr John M. Fairbrother pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au sein de son équipe, proposé ce sujet et guidé tout au long de sa réalisation. Je le remercie pour ces qualités humaines, pour les conseils et les connaissances qu'il m'a prodiguées et pour la compétence scientifique dont il a fait preuve durant la réalisation de ce projet.

Je tiens à remercier tout particulièrement :

- Dr Mario Jacques qui m'a fait l'honneur d'accepter la charge de présider ce jury
- Dr Sylvain Quessy, pour l'intérêt qu'il a manifesté, dès le début à l'égard de ce travail en tant que membre de comité de thèse et d'avoir accepté d'être membre de jury de cette thèse.
- Dr Albert Descoteaux, qui m'a fait l'honneur d'être rapporteur de ce travail.
- Dre Martine Boulianne, d'avoir été membre de mon comité de thèse, pour ses conseils et pour l'intérêt qu'elle a porté à ce projet.

Mes remerciements vont également à nos collaborateurs Dr Roy Curtiss III, Dre Maryvonne Dho-Shouler et Dr Charles Dozois qui ont suivi de près ce projet et contribué de façon efficace à la qualité de ce travail. Je les remercie particulièrement pour leurs conseils, leur lecture critique et appliquée des manuscrits.

Que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail trouvent ici toute ma reconnaissance et ma sympathie à savoir :

- Tous les membres du laboratoire de *Escherichia coli* et spécialement Clarisse Desautels et Brigitte Lehoux qui m'ont assistée dans la manipulation des poulets.

- François Caya qui a toujours été disponible pour répondre aux commandes des poulets et leur livraison à la faculté de Médecine vétérinaire. Je le remercie pour ces conseils de vétérinaire qui m'ont beaucoup aidés dans la mise au point de bonnes approches de manipulations des poulets.

- Je remercie Hélène Boucher, Yolande Beaudry, Manon Coutellier et Micheline St-Germain pour le support administratif.

- Je remercie Marco Langlois du service DGTIC de m'avoir aidée à imprimer les figures et photos couleurs de cette thèse.

- Je remercie ma famille qui malgré l'éloignement m'a toujours soutenue et encouragée. Un grand merci à mon frère Ahmed qui a toujours été présent et a toujours su trouver les mots d'encouragements, surtout dans les moments difficiles.



# **I. INTRODUCTION**

Les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (ou APEC) sont les agents étiologiques de la colibacillose chez les oiseaux. Ces bactéries sont responsables des infections extra-intestinales chez le poulet, la dinde, et les autres espèces aviaires. La forme la plus commune de la colibacillose est l'infection des voies respiratoires supérieures (aérosaculite), qui souvent se propage pour entraîner des infections généralisées (péritonite, périhépatite, péricardite, salpingite, omphalite, synovite, et septicémie). Les APEC sont également associés aux cellulites et aux granulomes.

Le point de départ de l'infection est souvent respiratoire, les oiseaux sont infectés par inhalation de poussières contaminées par des fèces. Les bactéries se multiplient dans les voies respiratoires supérieures puis transloquent vers le flux sanguin au niveau de la surface d'échange gazeux des poumons (Ackermann et Cheville, 1991; Cheville et Arp, 1978; Pourbakhsh *et al.*, 1997a; Rosenberg *et al.*, 1985) et des sacs aériens (Pourbakhsh *et al.*, 1997a), sites qui sont particulièrement vulnérables à la colonisation et à l'invasion des bactéries à cause de l'absence des macrophages résidents (Stearns *et al.*, 1987). Plusieurs facteurs biologiques et environnementaux prédisposent les oiseaux aux infections à *E. coli*. Les plus importants sont les infections virales et mycoplasmaïques, une faible ventilation et une surpopulation dans les poulaillers (Gross, 1994).

Les APEC appartiennent à un groupe limité de sérogroupes; les plus communs et les plus répandus dans le monde sont O1, O2, et O78. Les APEC se distinguent des



*E. coli* saprophytes par leurs facteurs de virulence. Les facteurs de virulence associés aux APEC sont les fimbriae de type 1 (F1A) et P (F11), les curli, l'aérobactine, la capsule K1, et une hémagglutinine sensible à la température (Tsh) (Gross, 1994; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999) et d'autres facteurs qui ne sont pas encore connus (Brown et Curtiss, 1996). La résistance au sérum semble être un mécanisme de virulence important chez les APEC, elle est souvent associée aux isolats septicémiques des dindes et des poulets (Dozois *et al.*, 2000; Wooly *et al.*, 1992). Une corrélation entre la résistance au sérum, la virulence et la létalité des isolats de poulets et de dindes atteints de colisepticémie a souvent été rapportée (Dozois *et al.*, 2000; Ellis *et al.*, 1988; Gross, 1994). À l'heure actuelle, on ne sait toujours pas si les mécanismes de résistance au sérum et de virulence des souches aviaires diffèrent de ceux des mammifères. Par contre des études réalisées sur les souches des mammifères ont montré que les facteurs de virulence les plus souvent associés à la résistance au complément des *E. coli* sont la capsule, le lipopolysaccharide (LPS) et les protéines de la membrane externe (OmpA, TraT, Iss) (Gross, 1994; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Le rôle des différents facteurs de virulence des APEC dans la résistance au sérum a souvent été spéculatif. Nolan *et al.* (1994) ont construit un mutant non virulent sensible au sérum à partir d'une souche virulente résistante au sérum. Le profil OMP du mutant s'est avéré différent de celui de la souche virulente et l'analyse de ce mutant a montré que, contrairement à la souche mère, il était incapable d'empêcher la déposition de C3 à la surface bactérienne (Kottom *et al.*, 1997).

Les fimbriae de type 1 sont constitués de sous unités majeures FimA et de l'adhésine FimH, qui a une grande affinité pour les mannosides (Orndorff, 1994). Ces fimbriae permettent aux APEC d'adhérer aux cellules épithéliales de la trachée et du pharynx des poulets *in vivo*. Les fimbriae de type 1 sont souvent exprimés par des bactéries isolées de la trachée, des poumons, et des sacs aériens des poulets infectés mais pas par celles isolées des organes internes ou du sang (Dozois *et al.*, 1994; Pourbakhsh *et al.*, 1997b). Seul un faible pourcentage de souches APEC possèdent des fimbriae de type P. L'expression du fimbriae P, *in vivo*, est soumise à une variation de phase. Les bactéries n'expriment pas le fimbriae P au niveau de la trachée mais plutôt au niveau des sacs aériens, des poumons et des organes internes du poulet (Pourbakhsh *et al.*, 1997b). Les structures agrégatives de surface, les curli, ont la propriété de se fixer aux complexes majeurs d'histocompatibilité de classe I (CMH-I), aux composantes de la matrice extracellulaire et aux protéines du sérum (Hewald *et al.*, 1998; Olsèn *et al.*, 1998), aux cellules intestinales aviaires (La Ragione *et al.*, 1999; 2000) et aux érythrocytes (Brown *et al.*, 2001) d'où la possibilité de leur implication dans les infections des APEC.

Le gène *tsh* associé aux APEC a souvent une localisation plasmidique et particulièrement sur le plasmide de virulence ColV (Dozois *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 1998a). Des résultats des infections *in vivo* ont montré que Tsh pourrait jouer un rôle dans les premières étapes de l'infection respiratoire (Dozois *et al.*, 2000).

L'antigène capsulaire K1 est fréquemment retrouvé chez les APEC, particulièrement chez les sérogroupes O1 et O2. Pourbakhsh *et al.* (1997c) ont démontré que les souches K1<sup>+</sup> étaient plus résistantes à l'effet bactéricide du sérum que les souches APEC exprimant d'autres antigènes K.

Les sacs aériens aviaires sont dépourvus de cellules de défense résidentes, la première ligne de défense est attribuée principalement à l'influx des hétérophiles, suivi de macrophages (Ficken *et al.*, 1986; Ficken et Barnes, 1989). Au niveau des voies aériennes des poulets infectés *in vivo*, les bactéries retrouvées dans le lumen étaient soit à l'état libres ou mélangées aux hétérophiles, aux érythrocytes et à la fibrine. À un stade avancé de l'infection, les APEC sont observés aussi bien dans les macrophages qu'à l'état libre dans les sacs aériens et les interstitia des poulets infectés (Pourbakhsh *et al.*, 1997a).

Le pouvoir invasif des bactéries semble être lié à leur degré de pathogénicité. Des infections expérimentales *in vivo* ont montré que les souches hautement pathogènes étaient plus aptes à envahir l'hôte que les souches faiblement pathogènes (Pourbakhsh *et al.*, 1997c). *In vivo*, les souches hautement pathogènes étaient plus souvent en contact des macrophages. En effet, les bactéries étaient soit adhérentes à la surface ou carrément à l'intérieur de ces phagocytes au niveau des sacs aériens et des poumons des poulets infectés. Les souches moins pathogènes étaient par contre rarement associées aux macrophages. *In vitro*, les souches pathogènes résistaient

beaucoup plus à l'effet bactéricide des macrophages aviaires que les souches moins pathogènes.

La réaction de l'hôte à une infection se traduit par une série complexe de réactions, dont la majorité sont effectuées par les macrophages. La nature et la chronologie des réponses dépendent du micro-organisme pathogène et de l'hôte lui-même. Les micro-organismes virulents ont développé une large variété de stratégies pour contrecarrer le système de défense inné (Wannemuehler, 1995). La modulation de la réponse immunitaire par les micro-organismes pathogènes détermine la pathophysiologie de l'infection. Bien que le pouvoir invasif des APEC n'est plus à démontrer, les stratégies mises en œuvre par ces bactéries pour éviter ou lutter contre la réponse immunitaire de l'hôte sont peu connues. L'extrapolation des résultats à partir de ceux obtenus chez les mammifères ne serait pas adéquate du fait de la particularité physio-anatomique des oiseaux et de leur système immunitaire.

La mise au point des stratégies efficaces de traitement et de prévention de la colibacillose chez les poulets passe par la connaissance des mécanismes de pathogénicité et de la réponse immunitaire aux infections aux APEC. Nous nous sommes appliqués à déterminer le rôle de différents facteurs de virulence des APEC dans la colibacillose aviaire. A cet effet plusieurs mutants ont été construits. Les objectifs visés dans cette étude étaient de déterminer:

1. La contribution spécifique des structures de surface (fimbriae P, la capsule K1, et le LPS O78) dans la colonisation des organes internes des poulets inoculés par les souches APEC ainsi que le rôle de ces facteurs et celui d'autres facteurs de virulence (fimbriae de type 1, curli, Tsh, et la région 0-min du chromosome) dans la résistance au sérum.
2. Le rôle de ces facteurs de virulence dans l'interaction des bactéries aux cellules de défense de l'hôte (hétérophiles et macrophages) en mesurant l'association, la viabilité et la persistance des bactéries associées aux phagocytes.
3. La réponse de l'hôte à l'infection aux APEC et le rôle des différents facteurs de virulence dans la modulation de la réponse immunitaire innée.

## **II. REVUE DE LA LITTÉRATURE**

## 1. Les différents groupes des *E. coli* pathogènes

### 1. 1. Généralités

La bactérie *Escherichia coli* a été découverte par Thomas Escherich en 1855. L'espèce type *Escherichia coli*, du genre *Escherichia*, de la famille des *Enterobacteriaceae* est un bacille Gram-négatif souvent mobile. Cette bactérie pousse facilement sur des milieux de culture généraux ou sélectifs (MacConkey, eosin méthylene-blue agar) à 37°C en aérobie. Les résultats des méthodes biochimiques, utilisées pour identifier cette bactérie, devraient être considérés parfois avec prudence. En effet bien que la majorité des *E. coli* soient lactose-positifs, certaines souches diarrhéogènes tels que les *E. coli* invasifs sont typiquement lactose-négatifs. Le test indole reste le meilleur test biochimique qui permet de différencier la bactérie *E. coli* des autres *Enterobacteriaceae*, puisque 99% des souches de *E. coli* sont indole-positives (Gross, 1994).

*Escherichia coli* est un commensal de l'intestin des animaux à sang chaud, y compris l'homme. Il représente jusqu'à 80% de la flore intestinale aérobie. La présence de cette bactérie ubiquiste dans certains milieux (eau, aliments, biofilms) est considérée comme un indice de contamination par les fèces. Le caractère versatile de la bactérie *E. coli* fait qu'on peut l'isoler des conditions et des milieux différents, d'où la diversité des souches décrites dans cette espèce.

La majorité des *E. coli* de l'intestin est saprophyte et leur présence est indispensable à la survie de l'individu grâce à leur capacité de synthétiser de nombreuses vitamines et à créer une barrière aux micro-organismes pathogènes. Certaines souches, à priori non pathogènes, peuvent créer des infections chez des individus immunodéficients. À la différence des souches saprophytes, les souches pathogènes possèdent des gènes de virulence qui leur permettent de créer des infections chez les mammifères incluant l'homme et les oiseaux (Gyles, 1994). La diversité et la combinaison des gènes de virulence associés aux *E. coli* déterminent la spécificité de l'hôte ainsi que la nature de l'infection.

Les premières classifications des souches de *E. coli* étaient basées sur leur appartenance à un nombre restreint de sérotypes O:K:H (Kaeckenbeeck, 1993; Lior, 1994). Cependant avec la découverte et la caractérisation des facteurs de virulence, la situation est devenue plus compliquée d'où les nouvelles classifications se basant soit sur les combinaisons des facteurs de virulence de ces souches (pathotypes), soit sur leur tropisme clinique. Les facultés d'adaptation des bactéries aux différents écosystèmes reposent sur leur capacité d'acquisition de nouveaux supports génétiques de facteurs de virulence (plasmides, bactériophages, éléments transposables..), d'où l'émergence de souches avec des propriétés nouvelles.

Les *E. coli* peuvent provoquer des infections soit à partir de leur habitat naturel (tropisme intestinal), soit à partir des milieux qui sont normalement exempts de cette bactérie (tropisme extra-intestinal).



## **1. 2. Les *E. coli* à tropisme intestinal**

Les *E. coli* entéropathogènes sont subdivisés en différentes classes fondées sur l'épidémiologie, les signes cliniques et les mécanismes de virulence.

### **1. 2. 1. Les *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC)**

Les souches ETEC ont été reconnues pour la première fois comme agent causal de la diarrhée chez les porcelets, et sont toujours responsables des infections létales chez les animaux nouveaux-nés (Nataro et Kaper, 1998). Elles sont impliquées dans des infections intestinales chez les ruminants et les porcs. Les ETEC sont responsables de diarrhée néonatale mais aussi de diarrhée post-sevrage chez le porc (Fairbrother *et al.*, 2000). Chez les humains, elles sont principalement responsables des diarrhées néonatales mais également des diarrhées chez des adultes voyageant dans des endroits chauds et humides (« diarrhée du voyageur »). La diarrhée de type aqueuse et aiguë entraîne la déshydratation du malade. Les bactéries adhèrent aux microvillosités des entérocytes de l'intestin grêle avec des adhésines dont certaines présentent une spécificité d'hôte [CFA pour les souches humaines, F4 (K88) pour les souches porcines, F5 (K99) pour les souches porcines et bovines, et F41 (dans de cas rare l'adhésine F17) pour les souches affectant les ruminants]. Les souches ETEC produisent des entérotoxines de type thermostable (ST) ou thermolabile (LT) qui sont

responsables de l'accumulation de fluide dans la lumière intestinale (Gyles, 1994; Nair et Takeda, 1997).

### 1. 2. 2. Les *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC)

Les EPEC sont généralement responsables des gastro-entérites chez les enfants et les jeunes animaux. La maladie se caractérise par une diarrhée aqueuse aiguë et persistante ainsi que des vomissements et une fièvre. Les bactéries adhèrent aux entérocytes du duodénum et du jéjunum par des fimbriae plasmidiques, elles s'attachent à la bordure en brosse, détruisent les microvillosités et altèrent le cytosquelette.

Les bactéries induisent une lésion histologique typique dénommée lésion d'attachement/effacement. Ces lésions ont été décrites chez le lapin et l'homme (Nataro et Kaper, 1998; Milon *et al.*, 1999) et ensuite chez d'autres espèces bovine, canine, féline, ovine et porcine (Fairbrother, 1993; Mainil et Pohl, 1994; Beutin, 1999). Les gènes de virulence des EPEC sont regroupés en îlot de pathogénicité LEE (pour locus of enterocyte effacement). Après l'attachement initial de la bactérie aux villosités intestinales via des fimbriae connus (BFP chez l'homme et AF/R2 chez le lapin) (Milon *et al.*, 1999) ou inconnus (Law, 1994), elle secrète diverses protéines dont la protéine EspB et les produits Sep à travers le système de sécrétion de type III qui induisent une augmentation de l'activité tyrosine kinase et du calcium intracellulaire entraînant un réarrangement du cytosquelette avec une accumulation

d'actine et l'effacement des microvillosités. La bactérie s'attache intimement aux cellules épithéliales grâce à la production d'une protéine de membrane externe, l'intimine codée par le gène *eaeA* et d'un récepteur Tir (pour translocated intimin receptor). L'expression de *eaeA* est activée par le produit du locus *per* (pour plasmid-encoded regulator) situé sur le plasmide EAF (pour EPEC adherence factor). Le réarrangement du cytosquelette et l'accumulation de l'actine à l'endroit de l'attachement de la bactérie forme un piédestal en forme de coupe. Les bactéries peuvent pénétrer dans la cellule, il s'agit du phénomène d'internalisation, celui-ci n'est toutefois pas systématique (Donnenberg et Kaper, 1991).

### **1. 2. 3. Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC)**

Ces bactéries sont responsables de ce qui est communément appelé "la maladie du hamburger", rapportée pour la première fois par Riley *et al.* (1983). Les auteurs avaient alors décrit une maladie gastro-intestinale particulière, la colite hémorragique. Les malades, avec peu ou pas de fièvre, souffrent de douleurs abdominales; ils ont une diarrhée aqueuse et hémorragique. Des oedèmes au niveau de la lamina propria du colon ont été observés. Des troubles rénaux et neurologiques peuvent être engendrés par la diffusion des cytotoxines (Nataro et Kaper, 1998). Le temps d'incubation est de 3 à 4 jours. Les souches en causes sont des souches vérotoxino-gènes, principalement de sérotype O157:H7, produisant une vérotoxine (VT) ou la toxine Shiga (Stx). Plusieurs espèces animales (bœuf, mouton, chat, chien et lapin) peuvent être des réservoirs de souches EHEC (Verweyen *et al.*, 2000).

Cependant, certaines souches EHEC peuvent être pathogènes pour les veaux nouveaux-nés (Mainil, 2000). Contrairement aux infections dues aux autres souches de *E. coli* des autres groupes, la présence de leucocytes est détectée dans les selles des malades. Les EHEC induisent les mêmes lésions attachantes et effaçantes que les EPEC et la majorité d'entre elles produisent une entérohémolysine dont le rôle reste inconnu (Nataro et Kaper, 1998).

#### **1. 2. 4. Autres *E. coli* entéropathogènes**

Plusieurs autres classes de *E. coli* peuvent être responsables d'infections à tropisme intestinal. Il s'agit entre autres des *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC) qui représentent un groupe hétérogène. Les EAEC sont responsables de diarrhées persistantes chez les jeunes enfants. Le trait caractéristique de ces bactéries est la formation d'agrégats lors de leur attachement aux cellules HEp-2. Les facteurs de virulence spécifiques des bactéries de cette classe sont le fimbriae AAF (aggregative adherence fimbriae) de type I ou II, une protéine de 108 kDa susceptible d'induire des lésions épithéliales et une toxine plasmidique thermostable dénommée EAST1 (EnteroAggregative ST) (Nataro *et al.*, 1992; Nataro et Kaper, 1998).

Les *E. coli* à adhésion diffuse (DAEC) se distinguent des EAEC par un phénotype d'adhésion diffuse sur les cellules HEp-2. Ils touchent principalement des jeunes enfants de 1 à 5 ans. Les malades ont une diarrhée aqueuse non sanglante et, contrairement à certaines infections, les leucocytes ne sont pas retrouvés dans les

selles. Les facteurs de virulence associés à ces bactéries sont notamment les adhésines F1845 qui appartiennent à la famille des fimbriae du groupe Dr (Bilge *et al.*, 1989) et une OMP nommée AIDA-1 qui est exprimée par une minorité des souches DAEC (Benz *et al.*, 1992).

Les *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) sont des bactéries apparentées à *Shigella* spp du point de vue génétique, biochimique et pathogénique. Les signes cliniques de la maladie induite par EIEC se caractérisent par une diarrhée aqueuse, des crampes abdominales, des selles sanglantes et une fièvre. Le mécanisme d'invasion des EIEC semble être identique à celui des *Shigella* (Nataro et Kaper, 1998). L'invasion des bactéries EIEC est liée à la présence d'un plasmide pInv qui code pour un système de sécrétion de type III. Les protéines exportées par le système de sécrétion du type III permettent à la bactérie d'envahir les cellules par endocytose, de rompre les vésicules d'endocytose, de se multiplier dans le cytoplasme et enfin de passer d'une cellule épithéliale à une autre en entraînant leur destruction. Nataro *et al.* (1995) ont isolé et séquencé un gène *sen* plasmidique des EIEC qui coderait pour une entérotoxine qui serait responsable de la diarrhée aqueuse des souches EIEC.

### **1. 3. Les *E. coli* à tropisme extra-intestinal**

Les ExPEC (pour extraintestinal pathogenic *E. coli*) sont responsables d'infections extra-intestinales à partir soit de l'intestin ou des autres sites (plaies, appareil respiratoire). Ces bactéries ont développé des stratégies qui leur permettent

de survivre et de se multiplier dans des milieux hostiles, pauvres en fer, et en présence des défenses immunitaires de l'hôte. Les ExPEC sont principalement responsables des infections urinaires, de bactériémies et de septicémies, ainsi que de méningites néonatales qui, souvent, laissent des séquelles chez le malade et peuvent même entraîner sa mort. *E. coli* est aussi responsable des infections intra-abdominales et des pneumonies nosocomiales. La majorité des ExPEC appartiennent à des groupes phylogéniques et à des sérogroupes O restreints (Johnson et Russo, 2002). Les facteurs de virulence associés aux ExPEC sont entre autres les adhésines (P, S, FIC, Afa), les toxines (hémolysines et CNF1), les sidérophores (aérobactine), les capsules (K1, K5, K12), les invasines, et des facteurs contribuant à la résistance au sérum et aux phagocytes. Les gènes de virulence des ExPEC ont souvent été retrouvés sur des îlots de pathogénicité (Blum *et al.*, 1994; Groisman et Ochman, 1996).

Les *E. coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables des infections urinaires (cystite, pyélonéphrite) chez l'homme. Les facteurs de virulence, retrouvés chez les UPEC, sont principalement les adhésines (P, Dr, S, Type 1), l' $\alpha$ -hémolysine, la sécrétion du sidérophore aérobactine et la synthèse de capsules du groupe II (K1 et K5). Certaines souches UPEC sécrètent un facteur CNF dont la fonction n'est pas clairement élucidée (Gyles, 1994; Johnson, 1997).

Les septicémies à *E. coli* se manifestent généralement chez les jeunes animaux de moins de 3 mois privés de colostrum et donc immunodéficients. Chez l'homme, elles se manifestent chez des jeunes personnes ou adultes immunocompromis

(neutropéniques). Les bactéries septicémiques résistent aux défenses de l'hôte grâce à leurs facteurs de virulence qui sont entre autres la capsule K1 et le sidérophore aérobactine. La lyse éventuelle des bactéries dans le sang entraîne un choc endotoxique, une hypotension et enfin une dégénérescence irréversible des organes vitaux.

Certaines souches de *E. coli* ont la capacité de franchir la barrière hémato-méningée et d'induire des méningites particulièrement chez les nouveau-nés et chez différentes espèces de mammifères. La majorité de ces souches expriment la capsule K1 et le fimbriae de type S (Sussman, 1997).

## **2. Les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC)**

Les APEC, qui font partie du groupe des ExPEC, sont responsables du complexe colibacillose aviaire qui se caractérise par une symptomatologie très polymorphe. Les infections à APEC sont essentiellement extra-intestinales, elles peuvent être soit localisées ou systémiques pouvant évoluer en septicémie létale (Gross, 1994; Barnes *et al.*, 2003). La colibacillose aviaire touche principalement les poulets et les dindes, mais également les canards, les faisans, les cailles et différentes espèces d'oiseaux sauvages.

Les élevages intensifs, créés pour répondre à la forte demande du consommateur, consistent à concentrer des centaines de poulets ou dindes dans des

locaux fermés standardisés. Ces conditions d'élevage font que la colibacillose aviaire est devenue une maladie cosmopolite sans caractère saisonnier (Gross, 1994; Barnes et Gross, 1997).

Les pertes économiques considérables engendrées par la colibacillose, qui s'estiment à des millions de dollars chaque année, sont principalement liées aux mortalités dans les élevages, aux saisies des carcasses lors de l'abattage, aux chutes de pontes et à la faible performance des oiseaux en convalescence ainsi qu'aux coûts de médications (Gross, 1994; Barnes *et al.*, 2003).

La majorité des *E. coli* impliqués dans les pathologies aviaires appartiennent à des sérogroupes particuliers dont les plus répandus sont O1, O2 et O78. Leur pathogénicité est conditionnée par des facteurs de virulence qui, le plus souvent, leur donnent un pouvoir invasif. Les APEC peuvent infecter les oiseaux à toute étape de leur vie, de l'embryon qui est encore dans l'œuf à l'oiseau adulte. Cependant les individus les plus vulnérables restent les jeunes oiseaux en croissance (Morris et Fletcher, 1988; Gross, 1994; Barnes *et al.*, 2003). Une variété de facteurs intra- et extrinsèques peuvent prédisposer les oiseaux aux infections colibacillaires. Il s'agit essentiellement d'infections primaires (virales ou mycoplasmaïques) ou de facteurs environnementaux (taux élevé d'ammoniac, une température inadéquate et un apport insuffisant d'eau et de nourriture). Ces différents facteurs contribuent à la déciliation de l'épithélium des voies respiratoires supérieures et à une immunodépression du poulet.



Les *E. coli* pathogènes sont présents naturellement dans la flore intestinale des oiseaux sains. En effet 10 à 15% des *E. coli* totaux appartiennent à des sérogroupes pathogènes (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Les voies d'infection sont le plus souvent respiratoires par inhalation de poussières contaminées par des fèces (infection du tractus respiratoire) et la contamination des œufs (omphalite) et des blessures engendrées par le grattage (cellulite).

Les symptômes de l'infection sont variés, les plus importants sont une difficulté respiratoire, des éternuements, une apathie et une dépression. Les oiseaux malades présentent le plus souvent une diarrhée et une fièvre. La mort de l'animal est souvent inévitable. Dans certains cas, les oiseaux infectés peuvent succomber subitement à l'infection sans aucun signe apparent.

### **2. 1. Les facteurs de virulence associés aux APEC**

Des études réalisées un peu partout dans le monde ont montré que les souches pathogènes aviaires possèdent des mécanismes ainsi que des antigènes de surface (somatique, capsulaire et flagellaire) particuliers qui sont rarement retrouvés chez les souches saprophytes.

### 2. 1. 1. Sérotype

La majorité des souches de toutes origines géographiques, isolées à partir d'organes internes d'oiseaux malades, sont de sérotypes O1:K1, O2:K1, et O78 qui, à eux seuls, peuvent représenter jusqu'à 60% des isolats sérotypables, par contre, 16% à 60% des souches s'avèrent non sérotypables. Bien que les sérogroupes les plus prépondérants soient O1, O2, O35, O36, et O78, un grand nombre de sérogroupes minoritaires a également été associé aux colibacilloses aviaires à savoir les sérogroupes O3, O5, O8, O11, O12, O15, O14, O18, O53, O55, O81, O85, O88, O102, O103, O152 (Arp et Jensen, 1979; Cloud *et al.*, 1985; Ike *et al.*, 1990; Panigrahy et Yushen, 1990; Dozois *et al.*, 1992; Allan *et al.*, 1993; Gross, 1994; Blanco *et al.*, 1997; 1998). La prévalence des sérotypes peut varier en fonction de la région géographique et de la période d'isolement (Cloud *et al.*, 1985; Ike *et al.*, 1990; Allan *et al.*, 1993; Wooley *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1998), mais également de l'espèce hôte (O86 et le canard) ou de la pathologie (O15 et synovite, O109 et aérosacculite, O115 et dermatite nécrotique) (Gross, 1994; Peighambari *et al.*, 1995; Ngeleka *et al.*, 1996).

### 2. 1. 2. Les OMPs Iss et TraT

Le gène *iss* (increased serum survival) a été décrit pour la première fois par Binns *et al.* (1979) chez les souches de *E. coli* humaines. La présence de ce gène,

véhiculé par le plasmide ColV, augmentait de 100 fois la virulence d'un *E. coli* chez les poussins de 1 jour (Binns *et al.*, 1979) et de 20 fois la résistance au complément (Chuba *et al.*, 1986; Barondess et Beckwith, 1990). La protéine Iss semble exercer un effet anticomplémentaire au niveau du complexe MAC (Waters et Crosa, 1991). La caractérisation du gène *iss* a montré qu'il avait des homologies importantes avec l'ADN du bactériophage lambda et selon certains auteurs, il serait le dérivé du gène *bor* du bactériophage lambda (Chuba *et al.*, 1989). Ce qui renforce cette hypothèse c'est le fait que Bor, qui est une protéine de l'enveloppe cellulaire des lysogènes lambda de *E. coli*, confère la résistance au sérum aux lysogènes (Barondess et Beckwith, 1990).

Les protéines TraT sont codées par des gènes situés dans la région de transfert des plasmides des groupes d'incompatibilité IncFI, IncFII, IncFIV. Ces protéines sont responsables de l'exclusion de surface induite lors du phénomène de conjugaison entre deux bactéries possédant des plasmides du même groupe d'incompatibilité (Achtman *et al.*, 1980). Ces mêmes protéines semblent conférer la résistance au sérum à certaines souches (Moll *et al.*, 1980). Le mécanisme d'action des produits des gènes *iss* et *traT* n'est pas clairement élucidé. Cependant, en présence ou en absence de Iss et TraT, la quantité de composants du complément C6, C7, C8 et C9 fixés par les bactéries est la même, ce qui suggère que les produits de *iss* et *traT* bloqueraient le fonctionnement du complexe MAC, mais pas sa formation (Binns *et al.*, 1982).

La caractérisation du gène *iss* chez une souche de *E. coli* pathogène aviaire a montré qu'il était identique à 96.8% au gène *iss* de *E. coli* humain (Horne *et al.*, 2000). Comme le gène *iss* est plus prévalant chez les *E. coli* isolés des oiseaux malades que chez les *E. coli* isolés des fèces des oiseaux sains, il jouerait probablement un rôle dans la virulence des souches APEC (Pfaff-McDonough *et al.*, 2000).

### **2. 1. 3. Fimbriae de type 1.**

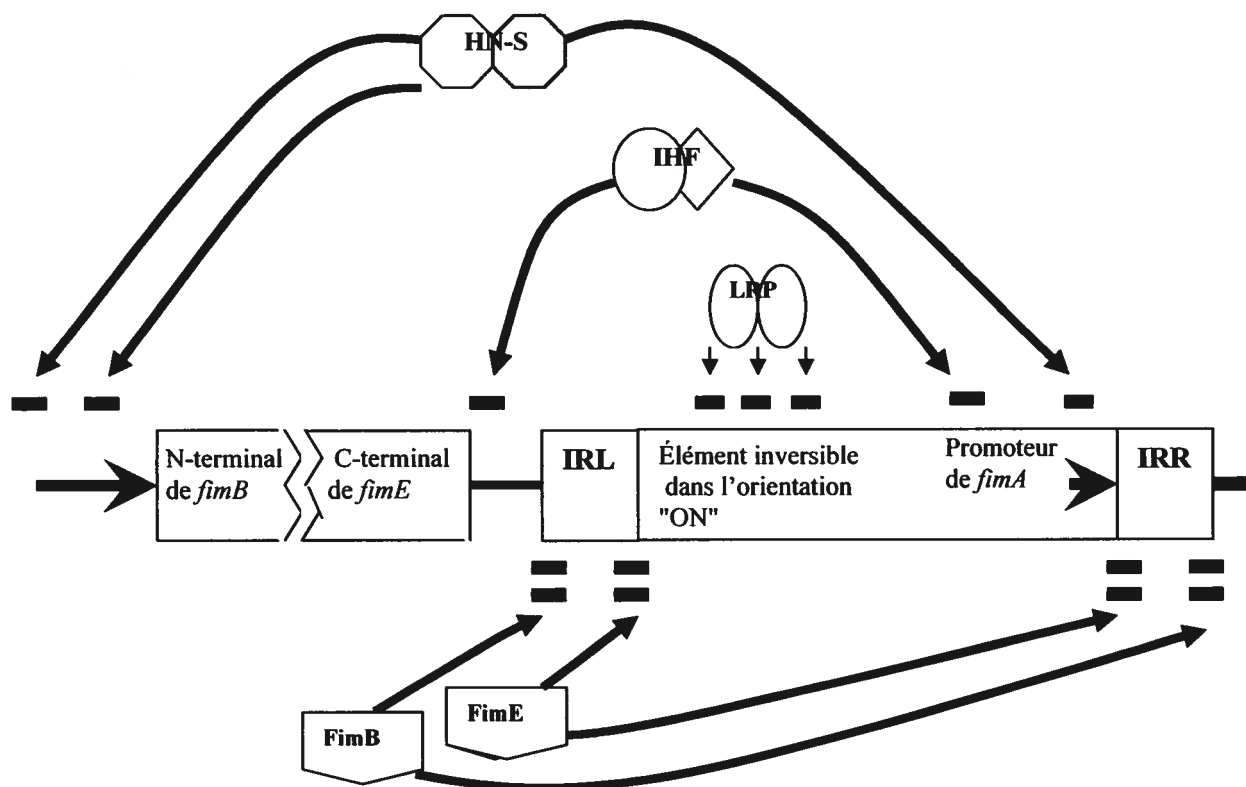
Les fimbriae de type 1 sont des structures somatiques communes des différentes espèces des *Enterobacteriaceae* (Duguid et Old, 1980 ; Klemm et Krogfelt, 1994), elles ont été purifiées à partir de plusieurs espèces bactériennes incluant *E. coli*, *Salmonella*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, et *Enterobacter cloacae* (Klemm et Krogfelt, 1994).

Les fimbriae de type 1 ont la capacité de se fixer aux récepteurs riches en mannosides qui se retrouvent au niveau des cellules épithéliales de la trachée, des macrophages, et sur plusieurs autres types de cellules. À cause de cette affinité particulière pour les mannosides, les fimbriae de type 1 induisent une agglutination mannose-sensible des érythrocytes des différentes espèces animales, des cellules de levure et d'autres cellules (Duguid et Old, 1980).

Les fimbriae de type 1 sont codés par le locus chromosomique *fim*, appelé également *pil* (Orndorff, 1994). L'opéron *fim* est constitué de neuf gènes différents (*fimB*, *fimE*, *fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimF* et *fimH*) qui codent pour les sous-unités structurales, les chaperons et les protéines régulatrices de l'expression du fimbriae.

Le fimbriae de type 1 est constitué de sous-unités structurales majeures FimA, associées aux sous-unités mineures FimF, FimG et à l'adhésine FimH. La sous-unité FimD reconnaît le complexe sous-unités-chaperons et l'assiste dans son emplacement dans la région de construction du fimbriae. La stabilité des composants du fimbriae lors de leur transport vers la membrane externe est maintenue par FimC. FimB et FimE sont des recombinaisons qui contrôlent l'expression du fimbriae de type 1 (Bahrani-Mougeot *et al.* 2002).

L'expression du fimbriae de type 1 est soumis à une variation de phase (Abraham *et al.*, 1985). La variabilité de phase du fimbriae de type 1 est contrôlée au niveau transcriptionnel par une extension d'ADN inversible (IR) (Figure 1). Le promoteur  $\sigma 70$ , responsable de la transcription de la sous-unité fimbriale FimA est localisé dans l'élément inversible de l'ADN. Les recombinaisons FimB et FimE reconnaissent les régions bordant la région inversible. Plusieurs molécules, entre autres LRP, IHF et H-NS affectent l'expression du fimbriae de type 1, en se fixant aux séquences d'ADN autour et dans la région de l'élément inversible. Ces molécules agissent en assistant ou bloquant l'action des recombinaisons FimB et FimE.



**Figure 1.** Mécanismes de régulation de l'expression du fimbriae de type 1.

Les molécules qui jouent un rôle dans la variation de phase du fimbriae de type 1 et leurs sites de fixation sont : **LRP** « leucine-responsive protein »; **IHF** « integration host factor »; **HN-S** « histone-like nucleoid structuring protein »; **IRR** « inverted repeat right »; **IRL** « inverted repeat left » (adaptée de Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

Des facteurs environnementaux semblent contrôler l'expression du fimbriae de type 1. *In vitro*, le fimbriae de type 1 est exprimé par les bactéries qui sont poussées dans des conditions statiques en milieu liquide. Alors qu'en milieu solide d'agar, les éléments inversibles sont dans l'orientation «Off», par conséquent, les fimbriae de type 1 ne sont pas exprimés par les bactéries (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002). La détermination du pourcentage d'éléments inversibles dans l'orientation «ON» *in vivo*, a permis de démontrer que les isolats d'*E. coli* contrôlent différemment l'expression du fimbriae de type 1 lors de leur infection (Gunther *et al.*, 2001). En effet, le pourcentage d'éléments inversibles dans l'orientation «ON» des *E. coli* isolés d'urine de souris infectées était faible (33.6%) chez les isolats des cystites mais élevé (84.5%) chez les isolats des pyélonéphrites.

Le fimbriae de type 1 serait responsable de la colonisation du tractus urinaire par les UPEC (Hultgren *et al.*, 1985; Schaeffer *et al.*, 1987; Thankavel *et al.*, 1997). Les *E. coli* uropathogènes semblent également utiliser le fimbriae de type 1 pour adhérer aux muqueuses de la vessie, induire l'apoptose des cellules hôtes et permettre ainsi l'invasion et la colonisation des tissus endommagés. Le fimbriae de type 1 serait également responsable de la transmission de bactéries d'un animal à un autre (Bloch *et al.*, 1992) et dans la formation de biofilms par les *E. coli* sur les surfaces abiotiques, ce qui permettrait à ces bactéries de persister dans les milieux extérieurs (Pratt et Kolter, 1998).

Chez le poulet, le fimbriae de type 1 est le plus souvent associé aux souches APEC qu'aux souches saprophytes (Dozois *et al.*, 1992; Wooly *et al.*, 1992). La caractérisation moléculaire et sérologique du fimbriae de type 1 des *E. coli* aviaires, principalement des sérogroupe O1, O2 et O78 isolés des oiseaux malades, a montré que chez le sérogroupe O78, les fimbriae sont de type 1A (F1A), alors que chez les autres sérogroupe O1 et O2, ils sont de type F1A-like (Suwanichkul *et al.*, 1987; Dho-Moulin *et al.*, 1990; Chanteloup *et al.*, 1991). La majorité des souches exprimant F1A ou F1A-like adhèrent *in vitro* aux cellules épithéliales respiratoires (Dho-Moulin *et al.*, 1990; Gyimah et Panigrahy, 1988). Dépendant de la souche APEC, l'adhésine FimH est soit localisée à l'extrémité terminale ou tout au long du fimbriae (Chanteloup *et al.*, 1991).

Le séquençage et l'analyse des gènes *fimH* et *fimA* de 24 souches APEC a montré que contrairement à FimA, FimH est hautement conservée parmi les souches testées. En effet, six régions variables se distinguent dans la protéine FimA et leur présence ne semble être associée ni au sérotype de la souche, ni au site d'isolement des bactéries (Vandemaele *et al.*, 2003).

Le rôle du fimbriae de type 1 dans la pathogénie des APEC est encore controversé. Selon certaines études, le fimbriae de type 1 permettrait aux bactéries d'adhérer à la trachée du poulet et ainsi contribuer à la virulence des APEC (Dho et Lafont, 1984; Pourbakhsh *et al.*, 1997b). D'autres travaux ont par contre démontré



que ni le fimbriae F1, ni l'adhésine FimH ne sont requis à la colonisation du tractus respiratoire des poulets (Arné *et al.*, 2000; Marc *et al.*, 1998). Selon Leclerc *et al.* (2003) le fimbriae de type 1 permettrait aux *E. coli* responsables des cellulites aviaires d'adhérer à la peau des poulets.

#### **2. 1. 4. Fimbriae de type P**

Les fimbriae P ont été identifiés pour la première fois chez les *E. coli* uropathogènes. Ils permettent aux bactéries d'adhérer aux cellules uroépithéliales. Les bactéries exprimant le fimbriae P agglutinent les érythrocytes humains et l'hémagglutination est résistante au mannose. Le récepteur du fimbriae P au niveau des érythrocytes est l'antigène sanguin P (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002). Les fimbriae P sont le plus souvent associés aux souches de *E. coli* responsables des infections urinaire (UTI) chez l'homme (Johnson, 1991) et le chien (Garcia *et al.*, 1988), et de septicémies chez le porc (Harel *et al.*, 1993). Ces fimbriae sont des hétéropolymères protéiques qui adhèrent spécifiquement aux isorécepteurs des cellules de l'hôte de type Gal( $\alpha$ 1-4)Gal (Strömberg *et al.*, 1990).

La biosynthèse et l'expression du fimbriae P sont codées par 11 gènes qui sont situés sur l'opéron *prs* (Pap-related sequence) localisé à 94 min sur le chromosome de *E. coli* sur un îlot de pathogénicité (Blum *et al.*, 1995). Les gènes *pap* de la souche humaine J96 ont été clonés (Hull *et al.*, 1981) et largement caractérisés.

Le fimbriae P est constitué de sous-unités majeures PapA et de sous-unités mineures PapE à leur extrémité. L'adhésine PapG, située à l'extrémité distale du fimbriae, est reliée à l'ensemble de la structure par PapF, et la fibrille est reliée à la tige par PapK. La tige du pilus est reliée à la membrane cellulaire par PapH. Quant aux produits PapD, PapC et PapJ, ils interviennent dans l'assemblage du pilus mais ne sont pas inclus dans la structure finale du fimbriae (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002)

Sur la base des différences antigéniques des protéines de structures PapA-like, les fimbriae P sont regroupés en au moins 11 sérotypes différents, désignés par F7<sub>1</sub> à F16 (Hacker, 1992). Trois classes d'adhésines de classe G (papG<sub>J96</sub> [classeI], papG<sub>AD/IA2</sub> [classeII], et prsG<sub>J96</sub> [classeIII]) ont été caractérisées en se basant sur leur affinité spécifique aux glycolipides de type Gal( $\alpha$ 1-4)Gal (Strömberg *et al.*, 1990). L'adhésine PapG variant I agglutine faiblement les érythrocytes de mouton mais fortement les érythrocytes humains et les globules P; PapG variant II agglutine les érythrocytes humains et ovins (mouton) et les globules P. PapG variant III agglutine les érythrocytes ovins (mouton) et humains mais pas les globules P ou les érythrocytes humains de type O traités à la neuraminidase. Les différentes adhésines sont associées de façon spécifique aux différents syndromes cliniques. Ainsi, PapGI, l'adhésine type de la souche humaine J96 (O4:K-:H5), est associée à la pyélonéphrite humaine alors que PapGII est associée aux pyélonéphrites et bactériémies humaines et, enfin PapGIII, est associée aux cystites chez les humains et aux infections génito-urinaires chez les chiens et chats.

Les souches d'origine aviaire expriment le fimbriae de type P (Achtmann *et al.*, 1986; Dozois *et al.*, 1992; 1995; Van den Bosch *et al.*, 1993; Vidotto *et al.*, 1997; Ngeleka *et al.*, 2002). Ces fimbriae sont principalement associés aux souches responsables des colisepticémies et d'aérosacculites chez les poulets (Dozois *et al.*, 1992; Van den Bosch *et al.*, 1993 et Pourbakhsh et Fairbrother, 1994). Selon Vandenberg *et al.* (1993), 78% des souches APEC expriment le fimbriae P, alors que selon d'autres études ce pourcentage n'est que de 41% (Dozois *et al.*, 1992) à 20% (Delicato *et al.*, 2003). La détection de ces fimbriae par des méthodes immunologique (Elisa) ou génétique (sonde *papC*) ont révélé que leur proportion chez les APEC est en réalité élevée. Cependant, la majorité des clones *papC*<sup>+</sup> présentent un locus incomplet qui ne leur permet pas d'exprimer les fimbriae (Dozois *et al.*, 1994; 1996). Les fimbriae P retrouvés chez les souches aviaires sont sérologiquement apparentés aux fimbriae F11 qui sont codés par le groupe de gènes *fel*. Les adhésines PapGII et PapGIII sont associées aux souches APEC, avec une prédominance de PapGII. L'analyse génétique des gènes des deux adhésines a montré qu'ils présentaient une forte homologie avec ceux des adhésines humaines (Vandemaële *et al.* 2003). Des études *in vitro* (Van den Bosch *et al.*, 1993; Dozois *et al.*, 1995) et *in vivo* (Pourbakhsh *et al.*, 1997b) ont démontré l'absence de récepteurs du fimbriae P au niveau de l'épithélium trachéal du poulet.

### 2. 1. 5. Curli

Les curli sont de minces fibres agrégatives de surface qui sont exprimées par des *E. coli* pathogènes ou saprophytes et par *Salmonella*. Ces fibres ont été décrites pour la première fois chez des *E. coli* des mammites bovines (Olsén *et al.*, 1989). La synthèse optimale des curli a été observée chez des bactéries en phase stationnaire de croissance, dans des conditions de basse température et de faible osmolarité (Collinson *et al.*, 1991; Olsén *et al.*, 1989; 1993).

Les gènes de synthèse de curli sont organisés en deux opérons inversés. Le premier opéron comprend les gènes *csgB*, *csgA* et *csgC*, et le second les gènes *csgD*, *csgE*, *csgF*, et *csgG*. Le gène *csgA* code pour les sous-unités majeures du curli qui sont exportées à la surface par les produits des gènes *csgG*, *csgF*, et *csgE*. Le monomère curli est polymérisé en filaments par la protéine nucléaire codée par *csgB*; le CsgD est un activateur transcriptionnel essentiel pour l'expression des deux opérons de fibre curline, et CsgG est une lipoprotéine extra-membranaire impliquée dans la stabilisation extracellulaire de CsgA et CsgB. L'opéron curli est régulé par les locus *crl*, *rpoS*, et *csgD* (Olsén *et al.*, 1993; Hammar *et al.*, 1996). Chez *Salmonella*, les fibres agrégatives apparentées aux curli sont codées par *agfA*, un gène qui est identique à 72% au *csgA* de *E. coli* (Collinson *et al.*, 1996).

Plusieurs propriétés ont été associées aux curli. On peut citer entre autres leur capacité à fixer les fibronectines, la laminine, et autres protéines du sérum, ainsi que les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (CMHI) et le colorant rouge Congo (Olsén *et al.*, 1993; 1998; Hammar *et al.*, 1995). Chez les bactéries *E. coli* et *S. enterica* sérovar Typhimurium, les curli sont également impliqués dans la formation de biofilms (Vidal *et al.*, 1998; Austin *et al.*, 1998; Reisner *et al.*, 2003). Le rôle des curli dans la pathogénèse des infections à *E. coli* n'est pas très connu. Cependant, la caractérisation biochimique et biophysique de ces structures a montré que les curli font partie de la famille des amyloïdes, substances qui sont souvent impliquées dans certaines maladies non infectieuses telles que la tremblante du mouton et la maladie d'Alzheimer (Chapman *et al.*, 2002). Selon Persson *et al.* (2003), les curli pourraient jouer un rôle dans la pathophysiologie des maladies infectieuses bactériennes en activant la cascade de coagulation du fibrinogène et dans l'induction des cytokines proinflammatoires.

La présence des curli chez les APEC a été démontrée (Provence et Curtiss, 1992). Bien que leur rôle dans la pathogénie n'est pas encore connu, les curli se retrouvent le plus souvent associés aux *E. coli* pathogènes qu'aux *E. coli* saprophytes (Maurer *et al.*, 1998a). La Ragione *et al.* (1999) ont rapporté qu'une insertion de IS1 dans le gène *csgB* des curli entraînait une diminution de la persistance de la souche O78 :K80 dans les infections des poulets.

Contrairement à *E. coli* K12 qui produit des curli à des températures inférieures à 30°C, certains *E. coli* pathogènes dont le *E. coli* pathogène aviaire  $\chi$ 7122, semblent produire les curli à des températures aussi élevées que 42°C (Province et Curtiss, 1992; Bian *et al.*, 2000). Les auteurs suggèrent une différence dans la régulation de contrôle dans l'expression de curli chez les différentes souches.

### **2. 1. 6. Hémagglutinine sensible à la température (Tsh)**

La présence d'une hémagglutinine sensible à la température chez une souche pathogène aviaire  $\chi$ 7122 (O78:K80) a été rapportée pour la première fois par Province et Curtiss (1994). En se basant sur la capacité de cette souche à agglutiner des érythrocytes, les auteurs ont démontré que la synthèse de cette protéine de surface est sensible à la température. Elle est en effet exprimée à basse température (26-30°C) mais pas à haute température (42°C), d'où son nom Tsh pour «temperature sensitive hemagglutinin». D'autres travaux ont démontré que, la protéine Tsh est produite à haute température (42°C) chez la souche aviaire  $\chi$ 7122. Cependant à des températures élevées, la protéine est libérée dans le milieu extra-cellulaire d'où son incapacité à agglutiner les érythrocytes (Stathopoulos *et al.*, 1999).

Le gène *tsh*, cloné de la souche aviaire  $\chi$ 7122, confère à *E. coli* K12 une hémagglutination mannose-résistante dans des conditions de basse température (26°C) et de faible osmolarité. Ce gène code pour une protéine de 140 kDa, dont la forme mature est de 118 kDa; qui exhibe 50% de similarité avec une protéase des

immunoglobulines A de *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae* (Provence et Curtiss, 1994). Tsh appartient à la famille des auto-transporteurs qui regroupe plusieurs facteurs de virulence de *E. coli* et des autres espèces bactériennes. Les plus connus sont les protéases des immunoglobulines A de *Shigella spp* et des différents pathotypes de *E. coli* : EspC et AIDA-I (ETEC); EspP/PssA (EHEC/StxEC); Pet et Pic (*E. coli* entéroaggrégatifs); et VirG/IcsA, SepA, et ShMu (*Shigella spp*). À l'exception de EspC et ShMu/Pic les gènes codant pour ces différentes protéines sont plasmidiques.

La Tsh est constituée de deux sous-unités complémentaires, la Tsh<sub>s</sub> qui est sécrétée à la surface et la Tsh<sub>β</sub> qui sert de tunnel à la première sous-unité. La fonction exacte de la protéine Tsh n'est pas connue. La présence d'un motif protéase serine chez cette protéine ne semble pas lui donner une activité protéolytique contre des IgA humaine et aviaire, ou de la caséine (Stathopoulos *et al.*, 1999). Cependant, une protéine identique à Tsh, dénommée Hpb, identifiée chez un *E. coli* humain, a quant à elle la capacité de dégrader spécifiquement l'hémoglobine humaine et de fixer l'hème (Otto *et al.*, 1998).

Dans le but de déterminer le rôle de Tsh dans la pathogénie des APEC, plusieurs études ont été réalisées. Selon Maurer *et al.* (1998a), Tsh est aussi souvent associée aux isolats cliniques d'origine aviaire qu'aux isolats d'animaux sains. Il semble également que les isolats *tsh*-positifs soient plus prévalant chez les isolats pathogènes que chez les isolats non-pathogènes (Dho-Moulin *et al.*, 1997).

Finalement, à la lumière des résultats des travaux de Dozois *et al.* (2000), le gène *tsh* qui est fréquemment localisé sur les plasmides de virulence des APEC, jouerait un rôle dans la pathogénie, spécialement dans les premières étapes de l'infection.

### 2. 1. 7. Les capsules

Les capsules polysaccharidiques sont des structures ubiquistes retrouvées à la surface d'un grand nombre d'espèces bactériennes. Elles sont liées à la surface des bactéries par des liaisons covalentes des phospholipides ou de lipide A. Bien que plus de 80 capsules polysaccharidiques (antigènes K) chimiquement distinctes aient été décrites chez les *E. coli*, seul un petit nombre d'entre elles est associé aux infections invasives (Ørskov et Ørskov, 1992). Des antigènes K particuliers peuvent être associés à des infections spécifiques. Par exemple chez l'homme, l'antigène K1 est souvent associé aux méningites néonatales (Robbins *et al.*, 1974).

Sur la base de leurs propriétés biologiques et chimiques, les antigènes K de *E. coli* étaient initialement subdivisés en deux groupes 1 et 2. Le groupe 2 a été ensuite subdivisé en groupe 2 et 3 et plus récemment, un quatrième groupe a été créé (Tableau 1) (Russo, 2002). Le groupe 4 regroupe des capsules qui ont beaucoup de similarités avec celles du groupe 1. Les capsules des groupes 1 diffèrent de celles du groupe 2 au niveau de leurs gènes de transport et d'assemblage et dans la régulation de l'expression des capsules.



Tableau 1. Les capsules des *Escherichia coli* (Russo, 2002)

Caractéristiques	Groupe 1	Groupe 2	Groupe 3	Groupe 4
Ancien groupe	IA	II	I/II	IB
Locus génétique	<i>cps, rfb</i>	<i>kps</i>	<i>kps</i>	<i>rfb</i>
Co-expression avec des antigènes O	Limité (O8, O9, O20, O101)	Plusieurs	Plusieurs	Limité (O8, O9) ou aucun
Co-expression avec l'acide colanique	non	oui	oui	oui
Thermostabilité à 100°C	oui	non	non	oui
Masse moléculaire	>100,00kDa (K-antigène)	<50,000 kDa	<50,000 kDa	>100,000 kDa (K-antigène)
Attachement aux cellules bactériennes	K-antigène : Inconnu K <sub>LPS</sub> : Via le core du lipide A	α-glycérophosphate	α-glycérophosphate	K-antigène : Inconnu K <sub>LPS</sub> : Via le core du lipide A
Systèmes models	K30, acide colanique	K1, K5	K54, K10	K40

Les antigènes K du groupe 1 et 4 ont un poids moléculaire élevé et une densité de charge plus faible que ceux du groupe 2 et 3. Ils sont constitués principalement d'acide hexuronique. Les capsules des groupes 1 et 4 peuvent se présenter sous deux formes différentes, la forme K-antigène de poids moléculaire élevé et la forme  $K_{LPS}$  de poids moléculaire faible. Les capsules  $K_{LPS}$  sont liés à la surface des cellules par le core du lipide A à la manière analogue à celle des lipopolysaccharides (LPS) (Roberts, 1996).

Les capsules du groupe 2 et 3 ont une densité de charge hautement plus élevée que celles des groupes 1 et 4. Elles sont constituées d'acides hexuroniques, d'acides N-acétylneuraminiques (NeuNAc) ou de KDO. Ces deux types de capsules sont coexprimées avec plusieurs antigènes O et leur expression est inhibée à basses températures (inférieure à 20°C).

Les capsules du groupe 2 sont codées par les gènes *kps* situés près de *serA* sur le chromosome de *E. coli*. Plusieurs gènes de ce groupe, entre autres ceux des capsules K1, K4, K5, K7, K12 et K92, ont été analysés et clonés. L'analyse moléculaire détaillée des gènes codant pour les antigènes K a montré qu'ils avaient une organisation génétique conservée et constituée de trois régions fonctionnelles. Les régions 1 et 3 sont conservées. Par contre, la région 2 est spécifique au sérotype. Les capsules du groupe 3 se distinguent de celles du groupe 2 au niveau de leurs gènes de transport et d'assemblage et aussi au niveau de l'organisation génétique et de la régulation.

Les gènes des capsules 2 et 3 sont similaires à ceux des capsules de *Neisseria meningitidis* et *Hemophilus influenzae*. Comparés aux gènes de *E. coli* K12, ils présentent un faible pourcentage de G+C. Les gènes des capsules du groupe 1 partagent, par contre, des similarités avec ceux des capsules de *Klebsiella* et *Erwinia*, d'où la possibilité d'une acquisition par transfert de ces gènes (Russo, 2002).

Les capsules semblent avoir des fonctions multiples. Les plus importantes sont la résistance à l'immunité spécifique et non-spécifique de l'hôte. En absence d'anticorps spécifiques, la capsule protège la bactérie de l'effet bactéricide du sérum et de la phagocytose en masquant des structures cellulaires qui pourraient être des activateurs potentiels de la voie alterne du complément (Howard et Glynn, 1971). Les capsules possédant des résidus NeuNAc sont de faibles activateurs de la voie alterne. En effet, elles peuvent fixer le facteur H du complément et, par conséquent, rompre le cycle d'amplification de la voie alterne du complément et empêcher la formation du complexe CAM (Michalek *et al.*, 1988).

Par leurs effets stériques et leurs charges négatives, les capsules peuvent conférer une résistance à la phagocytose médiée par le complément. En effet, les capsules empêchent le contact avec les macrophages grâce à l'effet de charge mais également en masquant les C3b déposés sur les structures de surface des récepteurs C3b des phagocytes. Si la phagocytose a lieu, elle est généralement peu efficace (Howard et Glynn, 1971). Certaines capsules peuvent avoir un effet indirect en

affectant l'induction de certaines cytokines et par conséquent perturber la coordination de la réponse immunitaire de l'hôte (Cross, 1990).

Certains polysaccharides capsulaires sont faiblement immunogènes, il s'agit essentiellement des capsules avec des résidus NeuNAc comme la capsule K1, et les capsules similaires au désulfo-héparine. Cette faible immunogénicité est due aux similarités structurelles entre les polysaccharides capsulaires et les tissus de l'hôte (Roberts, 1996).

Deux types de capsules (K1 et K80) associés à des sérotypes spécifiques sont décrits chez les APEC (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Les antigènes K1 sont fréquemment associés aux souches APEC de sérogroupes O1 et O2 et des souches non-typables. La capsule K80 est, quant à elle, associée au sérotype O78. Les capsules des APEC semblent jouer un rôle déterminant dans la pathogénie des souches APEC. Comparées aux souches non-capsulées, les souches exprimant la capsule K1 sont plus résistantes à l'effet bactéricide du sérum que les autres souches exprimant d'autres types d'antigènes K (Pourbakhsh *et al.*, 1997c). Elles sont également souvent hautement pathogènes et peuvent entraîner jusqu'à 100% de mortalité chez les poulets infectés (Ngeleka *et al.*, 1996). L'analyse génétique des souches APEC exprimant la capsule K1 a montré qu'elles appartenaient à un clone génétique spécifique (clone D) qui regroupe des *E. coli* virulents des septicémies humaines et des autres animaux (Ngeleka *et al.*, 1996).

La capsule K80 n'est pas bien caractérisée, cependant, Pourbakhsh *et al.* (1997c) avaient suggéré qu'elle agirait de façon similaire à la capsule O-antigène K'V165' dans la résistance de la souche O115 :K'V165' à la phagocytose et dans l'induction des septicémies chez les porcelets (Ngeleka *et al.*, 1994)

### 2. 1. 8. Systèmes d'acquisition du fer

Le fer est un élément indispensable à la croissance des micro-organismes. Or, dans l'organisme la concentration en fer libre est de l'ordre de  $10^{-18}$  M, quantité beaucoup trop faible pour permettre à la bactérie de croître. Le fer est séquestré par des glycoprotéines (transferrine dans le sérum, lactoferrine dans le lait et l'ovotransferrine dans le sérum). Le fer est également stocké à l'intérieur des cellules par les protéines telles que l'hème et les ferritines. Des bactéries pathogènes ont élaboré des systèmes de captation de fer, les plus importants sont des chélateurs de fer de faible poids moléculaires, les sidérophores (phénolates et hydroxamates), qui captent le fer du complexe protéine-Fe<sup>3+</sup> et le cèdent aux bactéries via des récepteurs spécifiques aux sidérophores ferriques (Griffiths, 1994).

L'opéron aérobactine, qui peut être plasmidique ou chromosomique, est constitué d'au moins cinq gènes de synthèse *iuc* (iron uptake chelator) et de transport *iut* (iron uptake transport) du sidérophore. L'ordre des gènes *iucABCD iutA* a été établi. Le gène *iutA* code pour le récepteur de l'aérobactine, par contre les autres gènes sont responsables de la synthèse de l'aérobactine (De Lorenzo *et al.*, 1986).

Les souches de *E. coli* pathogènes aviaires sont capables de croître dans des milieux pauvres en fer *in vitro* (Dho et Lafont, 1984). Ceci est principalement lié à la capacité de ces souches à exprimer un système d'acquisition de fer dénommé aérobactine (Lafont *et al.*, 1987). La production de l'aérobactine est plus fréquente chez les APEC que chez les souches non-pathogènes (Dozois *et al.*, 1992; Emery *et al.*, 1992; Linggood *et al.*, 1987). Il a clairement été démontré que la perte d'un plasmide ColV chez la souche APEC O2 entraînait la perte de sa virulence, de la résistance au sérum et du système aérobactine. La réintroduction de ce plasmide dans la souche restaure ces caractères (Ike *et al.*, 1992). Les tests de diagnostic basés sur la détection immunologique de la protéine IutA ont permis de montrer une forte corrélation entre la présence du système aérobactine chez les souches APEC et leur virulence.

### **2. 1. 9. Les toxines**

Contrairement aux *E. coli* pathogènes des mammifères, la production d'exotoxines par les APEC semble être exceptionnelle. Cependant différents travaux ont démontré que les souches aviaires pouvaient bien produire des toxines (connues ou inconnues). La présence d'une toxine thermostable de type STa chez une souche aviaire a été rapportée par Sekizaki *et al.* (1984). Selon Katwa et White (1992) des récepteurs spécifiques de cette toxine ont été retrouvés au niveau du tractus gastro-intestinal du poulet. Une entérotoxine thermolabile (LT) (Inoue *et al.*, 1993; Blanco *et al.*, 1994) ainsi qu'une activité vérotoxino-gène (Tsuji *et al.*, 1990; Fantinatti *et al.*,

1994) ont été également identifiées chez des souches aviaires. Les souches APEC de sérotype O86:K61 isolées des oiseaux sauvages sont capables de produire la toxine CLDT (pour cyto-lethal distending toxin). Ces souches possèdent en plus le locus LEE qui inclut le gène de l'intimine *eae* et sont capables de s'attacher intimement aux muqueuses et d'entraîner des lésions de type attachant et effaçant (A/E) décrites chez les EPEC. Le pouvoir invasif de ces souches a également été démontré (La Ragione *et al.*, 2002, Foster *et al.*, 1998, Pennycott *et al.*, 1998).

Bien que l'hémolysine de type  $\alpha$  n'ait jamais été retrouvée chez les souches aviaires, d'autres types d'hémolysines, telles que la  $\beta$ -hémolysine et une hémolysine non identifiée dont l'expression serait régulée par le gène *crp* (cyclic AMP receptor protein) peuvent être produites par ces souches (Fantinatti *et al.*, 1994; Nagai *et al.*, 1998).

## **2. 2. Relation génétique entre les souches APEC**

Plusieurs techniques génétiques ont été utilisées pour déterminer la parenté des souches APEC. Ces techniques permettent de regrouper des clones apparentés en groupes clonaux différents. Elles se basent généralement sur la détection électrophorétique des variants alléliques des gènes des enzymes métaboliques (isoenzymes). La majorité des isolats cliniques appartiennent à un nombre limité de clones. Les souches les plus virulentes se regroupent principalement dans les deux clones distincts B3 et D. Le séro groupe O78 se retrouve majoritairement dans le premier clone et O2 dans le second (White *et al.*, 1993a, 1993b).

Parmi les différentes techniques génomiques utilisées pour déterminer le polymorphisme génétique des souches APEC, on retrouve la RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), l'IS-typie (IS2) ou la ribotypie, les profils obtenus par la RAPD étaient les plus discriminatoires (Maurer *et al.*, 1998b). De même, la technique ERIC-PCR a permis de regrouper différents isolats en quatre groupes (A-D). Les isolats des omphalites et les commensaux se retrouvent dans un groupe distinct de celui des isolats des septicémies et du syndrome du gonflement de la tête, d'où la suggestion d'une relation étroite entre la pathogénicité et l'origine clonale (Dias da Silveira *et al.*, 2002).

### **2. 3. Pathologies associées aux APEC**

Les APEC sont à l'origine de plusieurs infections chez les espèces aviaires. La nature et l'intensité des différentes pathologies dépendent de la voie d'infection, de l'espèce infectée ainsi que de l'âge et du sexe des individus.

#### **2. 3. 1. Complexe respiratoire chronique et septicémie**

L'infection du tractus respiratoire est souvent observée chez des individus âgés de 2 à 12 semaines. Il s'agit de l'une des infections les plus communes qui affecte particulièrement les poulets de chair. Les pertes économiques sont liées aux taux de mortalités qui peuvent aller de 30 à 50%, et de morbidité pouvant dépasser les 50%,



mais également à une réduction significative de la croissance et du coût élevé de médication (Yogarattnam, 1995; Elfadil *et al.*, 1996).

L'infection se produit par inhalation de poussières contaminées par des fèces. Plusieurs facteurs biologiques et physiques peuvent prédisposer l'hôte à l'infection. Les facteurs biologiques les plus rapportés sont les infections primaires aux mycoplasmes (*Mycoplasma gallisepticum*) ou aux virus (Newcastle virus, Infectious Bronchitis virus). En ce qui à trait aux facteurs physiques, les plus incriminés sont les taux élevés d'ammoniac dans les poulaillers, les températures ambiantes trop élevées ou trop basses, ainsi qu'un apport d'eau et de nourriture insuffisant. Tous ces facteurs entraînent généralement une déciliation de l'épithélium des voies respiratoires supérieures des poulets et une immunodépression (Dho-Moulin, 1993; Gross, 1994).

Les signes cliniques de la maladie sont variés, les oiseaux perdent l'appétit. Se manifeste ensuite l'abattement, accompagné d'une hyperthermie (42 à 44°C). Les oiseaux éternuent et les plus atteints présentent alors une détresse respiratoire (bec ouvert, respiratoire accélérée et irrégulière). La mort de l'animal est souvent inévitable (Morris et Sojka, 1985).

L'infection peut se propager jusqu'aux organes internes. Les sacs aériens perdent leur transparence, s'épaississent et deviennent congestionnés avec présence d'exsudat séreux à fibrineux (aérosaculite). Les premiers signes microscopiques se caractérisent par une infiltration d'hétérophiles qui sera suivie de celle de phagocytes

mononucléaires, ces derniers seront majoritaires par la suite. L'infection atteint rapidement le cœur. Le péricarde devient opaque et œdémateux et se couvre d'un exsudat séro-fibrineux. La compression et l'infection du myocarde entraînent une chute de la pression sanguine. Les lésions au niveau du foie et de la rate sont surtout localisées en leur périphérie. Les organes deviennent congestionnés et se couvrent de fibrines (Gross, 1994).

### **2. 3. 2. Infection du tractus génital (ovarites et salpingites)**

Les infections à *E. coli* peuvent toucher l'appareil génital des poules pondeuses qui vont développer des ovaro-salpingites. La contamination de l'appareil génital des poules peut être due au contact avec le sac aérien gauche infecté, à la rupture de la paroi et à la péritonite. Elle peut également avoir une origine ascendante (insémination artificielle). Ces infections sont responsables de chutes de pontes. Alternativement, les APEC peuvent sporadiquement envahir la cavité péritonéale via l'oviducte et entraîner une péritonite puis la mort de l'individu et peuvent aussi être à l'origine des infections de la vésicule vitelline (Gross, 1994).

### **2. 3. 3. Mortalité des embryons et du jeune poussin**

L'infection de l'œuf ou précisément des membranes vitellines peut se produire durant les phases finales de l'incubation des œufs souillés. Les bactéries, véhiculées par les matières fécales de la poule, vont se déposer à la surface de l'œuf puis

pénétrer à travers les membranes de la coquille et contaminer ensuite la membrane vitelline.

L'origine de la contamination peut être reliée soit à une infection ovarienne (ovarite) et à une salpingite chez la poule pondeuse, mais également au mauvais état de la coquille. Les mortalités embryonnaires sont souvent constatées avant l'éclosion. Les œufs contaminés présentent des coquilles fragiles, leurs surfaces sont chaudes et humides. Les oiseaux issus d'embryons infectés qui survivent à l'infection ont généralement une durée de vie très limitée (moins de 3 semaines). Les poussins sont généralement atteints d'omphalite. Ceux qui dépassent les 3 semaines d'âge sont souvent atteints de péricardite (Gross, 1994).

#### **2. 3. 4. La cellulite (ou dermatite nécrotique)**

La dermatite nécrotique, décrite pour la première fois par Randall *et al.* (1984), touche principalement les poulets de chair âgés de plus de 4 semaines. Elle n'entraîne ni mortalité, ni signes cliniques. Elle se caractérise par l'apparition des lésions fibrineuses sous-cutanées. Les endroits les plus touchés sont la face ventrale de l'abdomen entre les cuisses et le cloaque. Les lésions sont souvent découvertes à l'abattoir, ceux-ci entraînent des saisies et par conséquent des pertes économiques importantes. Dans ce type de lésions, *E. coli* est isolé dans 60% des prélèvements, mais les cellulites peuvent parfois être associées à des pasteurelles ou à des streptocoques. Des lésions ont pu être reproduites par inoculation des follicules

plumifères à l'aide de la souche *E. coli* O78 (Barnes et Gross, 1997). Des lésions de grattages et des mauvaises conditions d'hygiènes sont généralement les principaux facteurs de risque.

### **2. 3. 5. Autres maladies associées aux APEC**

Le syndrome infectieux du gonflement de la tête («swollen head syndrome») est caractérisé par une inflammation aiguë et subaiguë de la peau et du tissu sous cutané de la tête et des régions périorbitales. *E. coli* a été incriminé comme agent pathogène secondaire, il est souvent associé aux virus (pneumovirus, paramyxovirus, coronavirus). Les *E. coli* de sérogroupe O115 et O2 isolés de volailles atteintes de syndrome infectieux du gonflement de la tête sont capables de reproduire la maladie dans les infections expérimentales, ce qui n'est pas le cas du virus impliqué inoculé seul (Gross, 1994; Barnes et Gross, 1997).

La coligranulomatose (ou maladie de Hjarre) est caractérisée par l'apparition de granulomes dans le foie, le cæcum, le duodénum, le mésentère. Ces lésions ressemblent à celles associées aux leucoses.

Bien que certains travaux suggèrent une étiologie colibacillaire des entérites chez la volaille (Joya *et al.*, 1990), l'association entre la maladie et le germe n'a pas encore été formellement établie (Gross, 1994; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). La caractérisation phénotypique et génotypique de souches de *E. coli* isolées de selles de

poulets diarrhéiques, a montré que la proportion de souches diarrhéogènes retrouvées communément chez les mammifères était faible, une seule souche était LT1 + F17+ Afa+ Pap+ (ETEC) et deux autres étaient Stx1 (VTEC). Par contre, la majorité des isolats appartenait plutôt au ExPEC (Mellata *et al.*, 2001).

#### **2. 4. Modèles expérimentaux utilisés pour étudier le pouvoir pathogène des APEC**

Plusieurs modèles expérimentaux ont été mis au point pour étudier la colibacillose aviaire et comprendre la pathogénie des souches isolées des poulets et dindes. Pour savoir si une souche isolée d'un élevage présentant une symptomatologie de la colibacillose est une souche pathogène ou commensale, différents tests expérimentaux sur modèles vivants ont été mis au point.

Les tests de létalité sont les premiers modèles mis au point pour déterminer la virulence des souches aviaires sur modèle animal. L'inoculation *in ovo* qui consiste à injecter un inoculum dans la cavité allantoïdienne d'embryons de poulets (Nolan *et al.*, 1992; Wooley *et al.*, 2000), ainsi que l'inoculation par voie sous-cutanée des poussins d'un jour (Nolan *et al.*, 1992) permettent de déterminer le taux de létalité en mesurant la dose létale 50 (DL50) des souches et il est ainsi possible de les classer en groupes très létales, létales et non-létales. Bien que ces modèles soient rapides, ils sont loin de la réalité de l'infection naturelle puisqu'ils court-circuitent la phase de colonisation initiale des bactéries.

D'autres modèles ont été mis au point pour reproduire la maladie naturelle. Ces modèles qui utilisent généralement des poulets SPF "specific pathogen free" de trois semaines d'âge permettent de déterminer l'implication réelle de la bactérie dans les infections particulières et de mieux comprendre les séquences chronologiques et la dynamique de l'infection (pathogénie). Les bactéries administrées par voie orale, par inhalation, par injection directe dans l'oviducte, dans la circulation sanguine ou dans les sacs aériens, permettent d'étudier des processus pathologiques des différentes infections (septicémie, aérosacculite ou ovarosalpingite). L'autre modèle utilisé consiste à préinfecter des poulets axéniques de 15 jours avec des virus avant de les infecter avec les colibacilles (Brée *et al.*, 1989; Dozois *et al.*, 1994; Arné *et al.*, 2000). Le but de ces modèles est de se rapprocher le plus possible des conditions naturelles de l'infection.

### **3. Particularités du système de défense des oiseaux**

Comparé au système immunitaire des mammifères, celui des oiseaux est moins connu. Les différences entre le système immunitaire des oiseaux et celui des mammifères sont multiples. La différence typique qui sépare les deux espèces est sans doute la présence de la bourse de Fabrisius chez les oiseaux et son absence chez les mammifères. En effet, les lymphocytes B chez les oiseaux se développent dans cet organe. De plus, contrairement aux mammifères, les oiseaux ne possèdent pas de système lymphatique développé, mais plutôt des agrégats lymphoïdes au niveau des systèmes respiratoire et digestif.

Le processus inflammatoire chez les oiseaux se distingue de celui des mammifères par la rapidité avec laquelle il se déroule. De plus, la réaction inflammatoire est de type caséux (granulomes) chez les oiseaux, contrairement à la formation d'un pus crémeux et liquéfié observé chez les mammifères. Cette différence de réaction est liée aux différences entre les leucocytes des deux espèces, spécialement au niveau de leur contenu enzymatique.

Plus de détails quant aux différences entre les systèmes immunitaires des oiseaux et des mammifères seront donnés dans les chapitres qui suivent.

### **3.1. Les éléments essentiels du système de défense inné des oiseaux**

Plusieurs particularités physiologiques et immunologiques des oiseaux font que les résultats et l'intensité des infections chez les oiseaux diffèrent de ceux retrouvés chez les mammifères. Dans les chapitres qui suivent, nous allons essentiellement décrire les éléments du système immunitaire inné des oiseaux qui déterminent la première ligne de défense chez l'hôte et qui, selon les éléments induits, détermine la pathophysiologie de l'infection et la nature des réponses protectrices subséquentes.

### **3 .1. 1. Particularités de l'appareil respiratoire des oiseaux.**

L'extrême sensibilité des oiseaux aux infections respiratoires est liée aux caractéristiques anatomo-histologique de leur tractus respiratoire, différentes de celles des mammifères.

Chez les oiseaux, il y a un contact étroit et direct entre les appareils respiratoire, digestif et génito-urinaire. Ce contact est rendu encore plus intime par l'existence des sacs aériens dont la disposition crée une continuité anatomique entre les poumons et l'ensemble des organes thoraciques et abdominaux. Les sacs aériens, peu irrigués par le sang, sont dépourvus de systèmes de défense et constituent par conséquent un refuge idéal pour les agents infectieux. Tous ces facteurs font qu'une infection au niveau du système respiratoire peut facilement se propager à d'autres organes.

Le système respiratoire supérieur a pour fonction de chauffer, humidifier, et filtrer l'air inspiré. La première ligne de défense du système respiratoire est localisée dans le pharynx dont la surface épithéliale est couverte de cils et de mucus sécrété par les cellules gobelets. L'épithélium de la trachée et des branches des poumons est constitué de cellules ciliées. Les cils se contractent en mouvements ondulatoires vers l'extérieur, ces vagues entraînent le mucus et toutes les particules qui y sont associées vers la cavité oropharyngienne où elles sont dégluties et, par la suite, éliminées dans



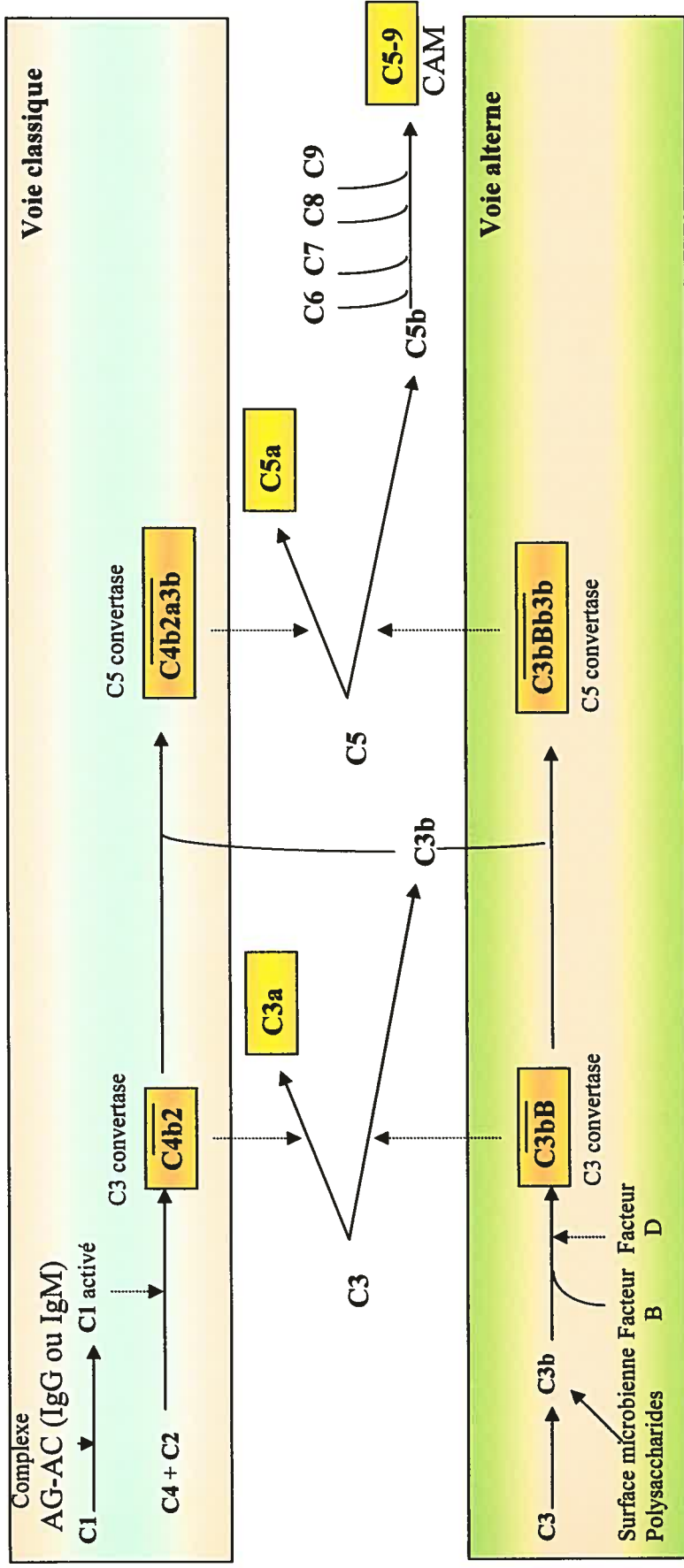
les fèces. Ce système semble être efficace pour éliminer les particules d'environ 4  $\mu\text{m}$ , par contre plusieurs molécules de 0.2  $\mu\text{m}$  réussissent à y échapper (Fedde, 1998).

### **3. 1. 2. Système du complément**

Le système du complément regroupe une trentaine de glycoprotéines, dont la majorité sont des zymogènes. Ces molécules circulent dans le sang sous leur forme inactive et c'est dans les compartiments extracellulaires qu'elles interagissent pour aboutir à la production de fragments de clivage biologiquement actifs qui promeuvent l'opsonisation et la phagocytose ainsi que la lyse directe des cellules.

Deux voies principales d'activation du complément se distinguent, la voie classique et la voie alterne. Les deux voies aboutissent à la formation d'une convertase qui clive C3 en C3a et C3b. La voie classique est activée par le complexe anticorps-antigène et la voie alterne est, quant à elle, activée par différents micro-organismes pathogènes (Figure 2) (Taylor, 1995).

Les deux voies peuvent être activées, souvent simultanément, par les bactéries Gram-négatives. La voie classique est normalement activée par le complexe anticorps-antigène, bien que dans certains cas, l'activation de la voie classique peut se produire sans intervention d'anticorps.



**Figure 2.** Les voies principales d'activation du complément. La voie classique est initiée par le complexe antigène-anticorps (AG-AC) et la voie alterne est initiée par la fixation de C3b aux surfaces activantes telles que les parois des cellules microbiennes. Les deux voies convergent et conduisent à la formation des médiateurs inflammatoires du complément (C3a et C5a) et du complexe d'attaque membranaire (CAM). Les bars au dessus des chiffres indiquent la forme enzymatiquement active des composants du complément, les flèches en pointillées indiquent l'activité protéolytique des différents composés. (Adaptée de Collins, 1999).

L'activation du complément en cascade facilite l'extravasation des mononucléaires dans le site de l'infection et la destruction des micro-organismes invasifs par opsonisation ou par l'action directe du complexe d'attaque membranaire (CAM). Les anaphylatoxines C3a, C4a, et C5a agissent sur les cellules mastocytes et les basophiles pour libérer de l'histamine et d'autres médiateurs inflammatoires, qui entraînent une vasoperméabilité et une vasodilatation. C5a est un agent chimiotactique pour les neutrophiles. Les phagocytes mononucléaires possèdent des récepteurs pour C3b et C4b qui permettent la fixation, l'internalisation et la dégradation des micro-organismes revêtus de protéines du complément.

L'activité anti-bactérienne du complément dépend de l'assemblage à la surface de la bactérie du complexe CAM. Ce complexe est le résultat de l'assemblage des différents composants C5b, 6, 7, 8 et un nombre variable de molécules C9 du complément. Ce complexe amphiphile s'insère dans les membranes des cellules. Le complexe C5b-8 peut entraîner la destruction et la lyse des membranes, un effet qui est hautement augmenté par l'incorporation de C9. Les pores formés entraînent un influx de solutés et d'électrolytes à travers les membranes cellulaires et par conséquent la perte irréversible de la viabilité de la cellule (Taylor, 1995). L'enveloppe cellulaire des Gram-négatifs représente une cible pour l'attaque du complexe C5b-8. La perte de viabilité suite à l'exposition du complexe dépend de l'irréversibilité des dommages de la membrane cytoplasmique.

Bien que l'activité lytique du complément dans le sérum aviaire ait été démontrée il y a presque un siècle par Muir (1911) (cité par Pastoret *et al.*, 1998), la caractérisation de la nature des composants C du système du complément aviaire ainsi que leurs voies d'activation n'est qu'à l'état embryonnaire. Ce n'est que récemment que la présence de macromolécules dans le sérum aviaire a été démontrée. Leurs structures et fonctions se rapprochent de celles des composants C du complément des mammifères. Le niveau de complément dans le sérum aviaire dépend de la lignée de poulet (Chanh *et al.*, 1976; Shen *et al.*, 1984; Parmentier *et al.*, 2002).

Les composants C3 des poulets et de cailles sont similaires à ceux des mammifères, ils ont la même taille et possèdent des liaisons thiolester réactives (Mavroidis *et al.*, 1995). Les produits d'activation de C3, C3a et C3b sont identiques à ceux décrits chez les mammifères. L'analyse de la séquence ADNc de C3 du poulet a montré qu'elle était identique à celle de C3 humain et à celles des autres espèces. La présence du facteur B a également été démontrée chez la volaille. Une fois activé, il est clivé au niveau des mêmes sites que ceux identifiés chez le facteur B des mammifères (Koch, 1986a). Comme chez les mammifères, le facteur B aviaire exhibe un polymorphisme génétique. Contrairement à ceux des mammifères, il ne semble pas être lié au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) (Koch, 1986b).

L'activité de C4, détectée dans le sérum aviaire avec des réactifs humains et de cobayes, était très faible. La faible activité de C4 est attribuée soit à une faible compatibilité avec les réactifs C des mammifères ou à la faible quantité de ce

composé dans le sérum aviaire (Pastoret *et al.*, 1998). De plus, Wathen *et al.* (1987) ont détecté la présence dans le plasma aviaire d'une protéine qui réagit à l'antisérum anti-C4 humain et l'analyse électrophorétique de C4 a révélé la présence soit de trois bandes dans le cas du sérum des oiseaux adultes ou de deux bandes dans le cas du sérum des oiseaux immatures, ce qui suggérait la présence d'un composant C4 fonctionnel.

Le C6 aviaire est hautement polymorphique, il possède sept variants alléliques distincts. L'activité de C6 a été démontrée chez plusieurs espèces aviaires. De plus des études ont démontré que le plasma aviaire possédait des activités de clivage équivalentes à celles du facteur I des mammifères et son cofacteur (le facteur H) (Pastoret *et al.*, 1998).

L'activité de la voie alterne du complément a bien été démontrée chez les oiseaux en utilisant des érythrocytes hétérologues, elle est responsable de l'activité bactéricide du plasma de poulet et de la dinde.

Le C1q aviaire est identique à celui des mammifères. Son activation a été démontrée en utilisant des anticorps des mammifères (Yonemasu et Sasaki, 1986). La présence de C1q ainsi que l'existence d'une voie lytique nécessitant la présence de  $\text{Ca}^{2+}$  et de  $\text{Mg}^{2+}$  dans le sérum de poulet (Koch, 1986c), sont des caractéristiques qui rappellent celles de la voie classique du complément décrite chez les mammifères.

Les travaux de Koch (1986c) ont montré que la destruction du facteur B dans le sérum aviaire abolissait l'activité lytique des voies classique et alterne, ce qui suggère que le facteur B aviaire participe aussi bien à la voie alterne qu'à la voie classique du complément. D'autres travaux ont démontré que le venin de cobra diminuait l'activité de la voie alterne du complément mais pas celle de la voie classique (Ohta *et al.*, 1984). Ceci suggère la présence d'un composant sensible au facteur du venin de cobra qui est associé uniquement à la voie alterne. Par conséquent l'existence de deux voies C distinctes ne peut pas être écartée.

L'importance de la résistance au sérum dans le développement de la colibacillose a été démontrée chez les poulets. Les isolats résistants au complément sont généralement plus virulents que les isolats sensibles (Ellis *et al.*, 1988). La résistance au sérum est souvent associée aux isolats des dindes septicémiques et à la létalité (Dozois *et al.*, 1992; Ike *et al.*, 1992 ; Nolan *et al.*, 1992). De plus, la résistance au sérum est plus souvent retrouvée chez les isolats des poulets septicémiques que chez les isolats des poulets sains (Wooley *et al.*, 1992).

### **3. 1. 3. Les phagocytes professionnels des oiseaux**

Plusieurs cellules du système immunitaire inné des oiseaux sont considérées comme des éléments essentiels dans la lutte contre les infections. La chronologie de leur intervention lors de la réaction inflammatoire dépend essentiellement de la nature de l'agent infectieux.

### 3. 1. 3. 1. Hétérophiles

Les hétérophiles aviaires sont l'équivalent des neutrophiles chez les mammifères. Les hétérophiles matures sont des cellules rondes d'environ 13  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces cellules sont caractérisées par un noyau constitué de deux à trois lobes et leur cytoplasme incolore granulé. Bien que plusieurs similarités existent entre les hétérophiles et les neutrophiles, d'importantes différences les séparent. Ces différences se retrouvent essentiellement dans le contenu des granules et dans la réponse aux stimuli. Les hétérophiles sont dépourvus de myéloperoxydase et de la phosphatase alcaline (Harmon, 1998). Contrairement aux neutrophiles, les hétérophiles de poulet et de dinde ne répondent pas au formyl-méthionyl-leucyl-phenylalanine (fMLP). De plus ils ne produisent que de faibles quantités de radicaux oxygénés (Brooks *et al.*, 1996; Kogut *et al.*, 1998) et d'oxyde nitrique (Crippen *et al.*, 2003). Le système de défense des hétérophiles est essentiellement oxygène-indépendant, il se base sur la présence de  $\beta$ -défensines et de lysozymes dans les vacuoles (Evans *et al.*, 1995). Il a été démontré que l'extrait brut des hétérophiles était capable de tuer les *E. coli* et *S. aureus in vitro* mais pas *P. multocida* alors que les hétérophiles intacts étaient capables de tuer les trois espèces bactériennes (Harmon *et al.*, 1992). Le mode d'action des  $\beta$ -défensines ou peptides cationiques est lié à leur nature amphiphilique. En effet, elles se fixent aux sites chargés négativement des membranes microbiennes pour les déstabiliser (Kagan *et al.*, 1990).

Le spectre d'activité des défensines est très large, il comprend les Gram-positifs et les Gram-négatifs, les champignons et certains virus (Harmon, 1998)

Le pouvoir phagocytaire des hétérophiles est controversé. Selon certaines études, les hétérophiles sont incapables de phagocyter les particules de carbone (Awadhiya *et al.*, 1980) et le bleue de trypan (Carlson et Allen, 1969). Par contre, d'autres travaux ont démontré que les hétérophiles étaient bien capables de phagocyter les bactéries (cité par Harmon, 1998). Les hétérophiles sanguins des poulets atteints de tenosynovite causé par les staphylocoques ont une activité phagocytaire plus élevée que ceux des poulets sains (Andreasen *et al.*, 1991). Selon Carlson et Allen (1969), les hétérophiles phagocytent les particules de façon sélective.

### **3. 1. 3. 2. Macrophages**

La cavité abdominale et le tractus respiratoire des oiseaux sont des sites qui possèdent peu ou pas de macrophages résidants. Par conséquent, les oiseaux dépendent surtout de l'influx rapide des phagocytes vers les sites d'infection comme défense non-spécifique contre les bactéries et les autres micro-organismes pathogènes (Toth et Siegle, 1993).

Les macrophages aviaires possèdent des récepteurs de surface pour la portion Fc des immunoglobulines (Duncan et MacArthur, 1978) et pour le C3b (Dietert *et al.*,



1991), qui leur permettent de phagocyter des particules opsonisées. Ils sont également capables de phagocyter les particules non-opsonisées (Qureshi *et al.*, 1986; Powell, 1987). Les macrophages aviaires sont capables de migrer en réponse à des facteurs chimiotactiques tel que *f*MLP (Qureshi *et al.*, 1988; Golemboski *et al.*, 1990). Des intégrines apparentées aux protéines Mac-1 et LFA des mammifères ont été retrouvées chez les macrophages aviaires (Hynes, 1987).

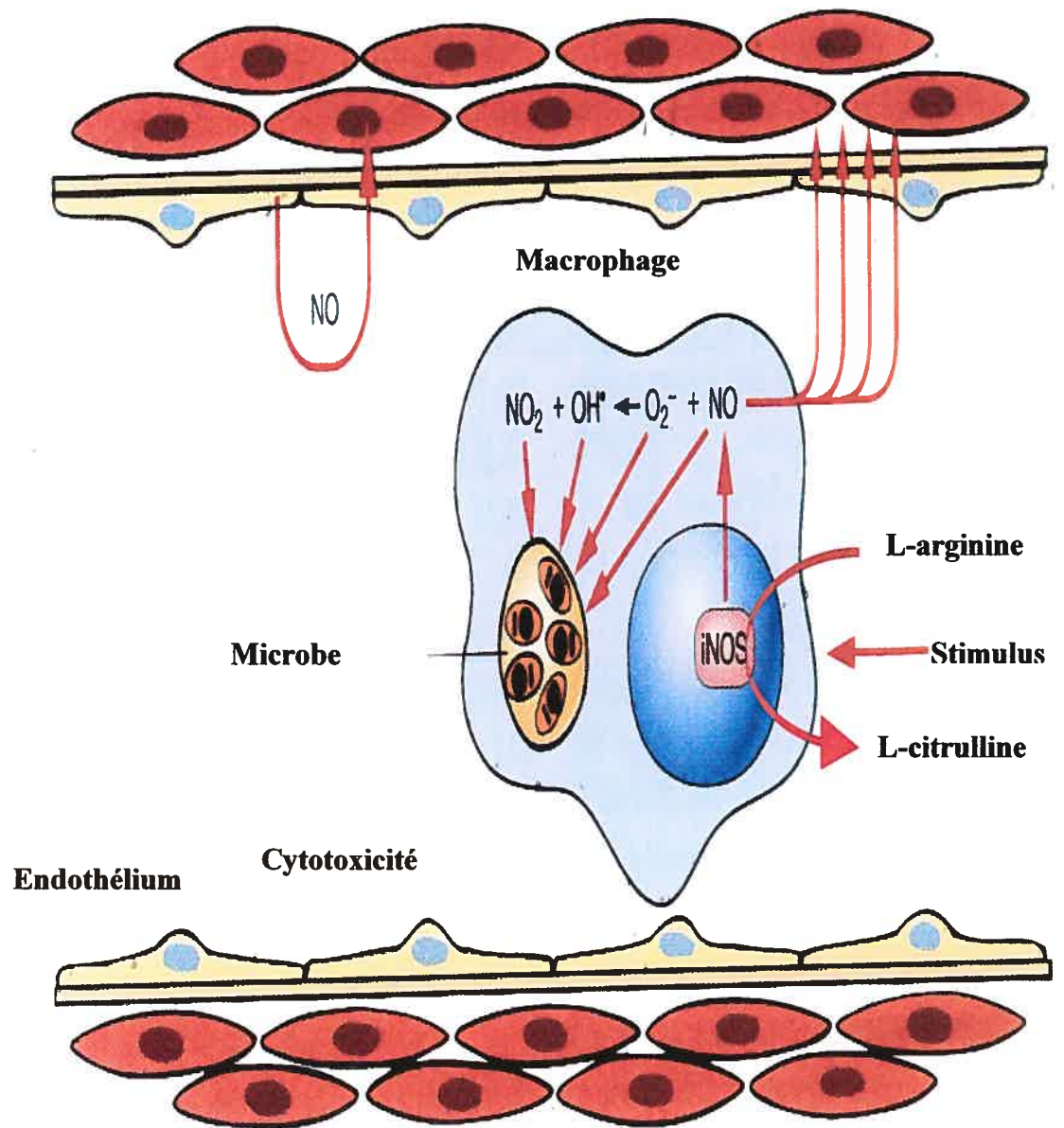
Plusieurs facteurs peuvent influencer le résultat de l'interaction pathogène-macrophage en affectant le fonctionnement des macrophages. Parmi ces facteurs figurent l'état d'activation du macrophage, la nature de l'agent infectieux, le facteur génétique, la nutrition et les facteurs environnementaux.

Deux principaux mécanismes de défenses sont élaborés par les macrophages contre les micro-organismes pathogènes invasifs, le mécanisme oxygène-dépendant et le mécanisme oxygène-indépendant (Qureshi *et al.*, 2000).

### **3. 1. 3. 1. 1. Système de défense oxygène-indépendant**

L'oxyde nitrique (NO) est produit lors de la conversion de l'arginine en citrulline par une enzyme, l'oxyde nitrique synthétase (Figure 3). Chez le poulet, la production de NO par les macrophages est également arginine-dépendant (Sung *et al.*, 1991). Cependant, contrairement à la majorité des mammifères, à cause de son cycle urique incomplet, le poulet est incapable de synthétiser l'arginine.

### Vasodilatation et relaxation du muscle vasculaire lisse



**Figure 3.** Synthèse de l'oxyde nitrique (NO) dans le macrophage activé. NO est le produit du métabolisme de L-arginine en L-citrulline par iNOS. Les radicaux libres de NO sont cytotoxiques pour les cellules microbiennes et les cellules de l'hôte et entraînent une vasodilatation (Adaptée de Collins, 1999).

De ce fait, il est complètement dépendant des facteurs environnementaux, tel que l'apport de l'arginine par l'alimentation (Tamir et Ratner, 1963; Sung et Dietert, 1994).

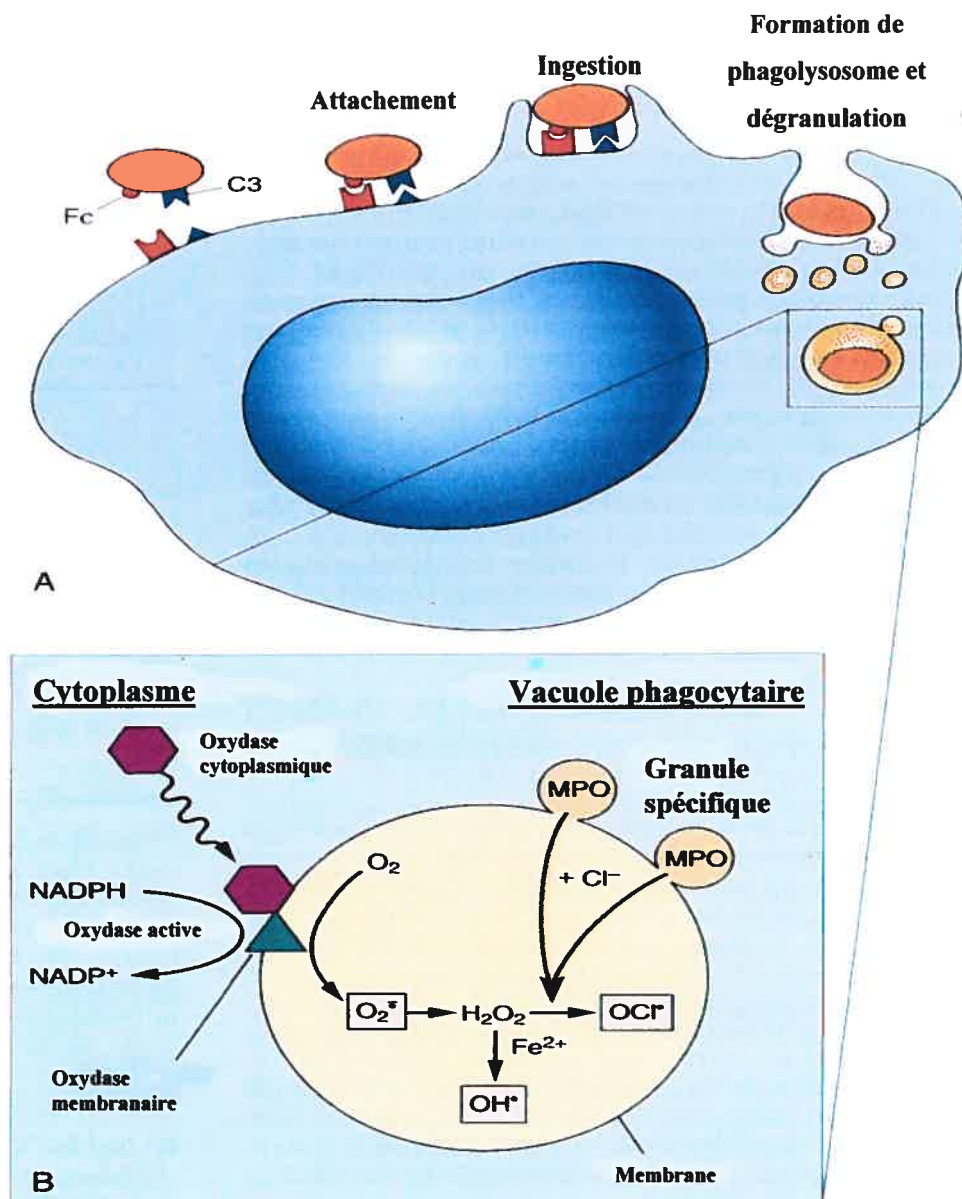
Le gène inductible iNOS des poulets a été séquencé et cloné (Lin *et al.*, 1996). L'activité maximale de iNOS des macrophages est induite par la combinaison de l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ) et le LPS (Kaspars *et al.*, 1995 ; Suresh *et al.*, 1995).

En testant différentes lignées cellulaires de macrophages aviaires, dans des mêmes conditions de culture, Hussain et Qureshi (1998) ont démontré que les macrophages des lignées différentes activés avec du LPS, produisaient des quantités différentes d'ARNm du gène iNOS. Ces résultats suggèrent une régulation transcriptionnelle des gènes de iNOS aviaires.

### **3. 1. 3. 1. 2. Système de défense oxygène-dépendant**

Les cellules inflammatoires aviaires, y compris les macrophages, sont capables de produire des dérivés d'oxygène activés (Dietert et Golemboski, 1998), leur importance dépend de la génétique des poulets (complexe B).

L'élimination de la majorité des organismes extra-cellulaires par les phagocytes mononucléaires dépend de la capacité des phagocytes à convertir l'oxygène en produits microbicides (Figure 4). La phagocytose via FcR permet aux macrophages



**Figure 4. (A)** Étapes de la phagocytose. L'ingestion d'une particule (bactérie) implique l'attachement et la fixation de Fc et C3b aux récepteurs sur la membrane des leucocytes, l'ingestion et la fusion des granules avec les vacuoles, suivie de dégranulation. **(B)** Résumé du mécanisme bactéricide oxygène-dépendant dans la vacuole phagocytaire (Adaptée de Collins, 1999).

activés d'oxyder le glucose par la voie hexose monophosphate pour produire le NADPH. La NADPH-oxydase des phagocytes, situé au niveau de la membrane des phagosomes, forme une chaîne de transfert d'électron, qui va permettre la conversion de l'oxygène en superoxydes et en d'autres intermédiaires d'oxygènes toxiques.

Le peroxyde d'hydrogène sert de substrat pour la myéloperoxydase (MPO) à la génération de métabolites hautement toxiques. L'activité peroxidase n'a pas été détectée chez les mononucléaires aviaires (Egami et Sasso, 1991; Van Nerom *et al.*, 1997; 1998).

### **3. 1. 3. 3. Impact génétique sur la fonction des phagocytes**

Plusieurs études ont démontré que des facteurs génétiques pouvaient influencer la réponse inflammatoire des phagocytes aviaires et par conséquent la résistance des poulets aux infections. Les facteurs les plus étudiés sont entre autres les CMH, les Nramp-1 et les TLRs.

#### **3. 1. 3. 3. 1. Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH)**

Le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), désigné par le complexe B chez le poulet, est composé de glycoprotéines trans-membranaires qui sont essentielles dans la présentation des antigènes aux lymphocytes T. Les molécules CMH (classe I, classe II et classe IV ou B-F, B-L et B-G respectivement)

appartiennent à la superfamille des immunoglobulines avec des régions extracellulaires composées de deux domaines fixant le N-terminal des antigènes et de deux domaines constants qui se fixent aux récepteurs analogues sur les membranes des cellules T (Lamont, 1998). Les molécules de classe I sont présentes sur toutes les cellules. Les molécules de classe II sont exprimées par les cellules présentatrices d'antigènes. La classe IV, présente uniquement chez les espèces aviaires, est exprimée par les érythrocytes, les cellules du foie, les lymphoblastes thymiques et bursales et les cellules stromales.

Les poulets ont relativement peu de gènes de CMH, ils sont regroupés au niveau d'une petite région de 92 kb qui ne représente que 5 % de la région CMH des mammifères. Il existe plus de 28 haplotypes de CMH qui sont désignés comme des sérotypes.

Chez le poulet, le CMH est intimement lié à la résistance ou à la susceptibilité aux différentes maladies virales, bactériennes, parasitaire et auto-immunes (Lamont, 1998). Le CMH a un effet régulateur sur plusieurs réponses immunes Il est impliqué dans la réponse anticorps, la production de cytokines et l'activité des cellules tueuses naturelles NK (pour natural-killer). Les différents haplotypes CMH montrent des différences chimiotactique des leucocytes mononucléaires, les fonctions effectrices des macrophages telles que la phagocytose, l'effet bactéricide, la réponse oxydative et la synthèse de l'oxyde nitrique.

Il s'est avéré que le pouvoir phagocytaire des macrophages dépend également de la génétique des poulets. Qureshi *et al.* (1986), avaient démontré que les macrophages des poulets des lignées 15.6- $B^2$ , 16.7- $B^2$  et 15.P- $B^2$  avaient un pouvoir phagocytaire sur les globules rouges de mouton, opsonisés ou non, beaucoup plus important que ceux des lignées 15.1- $B^2$  et 15.C- $B^2$ . Cependant, l'élimination intracytoplasmique de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium par les macrophages de 15.P- $B^2$  était peu efficace, les auteurs avaient suggéré que la phagocytose et l'effet bactéricide pouvaient être régulés différemment. En effet, l'induction d'anions superoxydes (Puzzi *et al.*, 1990) et le niveau de production d'oxyde nitrique (Hussain et Qureshi, 1997) étaient différents chez les macrophages des différentes lignées. Qureshi *et al.* (1988) ont également démontré que les monocytes sanguins de poulets de différents haplotypes *B* répondaient différemment aux différents facteurs chimiotactiques. Hala *et al.* (1998) ont également démontré que les macrophages des lignées différentes de poulet différaient dans leur habilité à adhérer au verre. Les gènes impliqués dans ce phénomène sont localisés dans la région B-F/L.

Les poulets à croissance rapide sont connus pour être génétiquement moins résistants aux maladies. Les poulets sélectionnés pour leur croissance rapide étaient en effet sensibles aux infections virales (Han et Smyth, 1972). Il s'est avéré que les fonctions des macrophages des différentes lignées de poulets utilisées dans les élevages industriels étaient significativement différentes (Qureshi et Miller, 1991).

### **3. 1. 3. 3. 2. Les protéines Nramp-1 (natural resistance associated macrophage protein 1).**

Nramp-1 est une phosphoglycoprotéine membranaire des macrophages impliquée dans la résistance à l'infection par des bactéries intracellulaire (Cellier *et al.*, 1996; Vidal *et al.*, 1996). Les protéines Nramp eucaryotiques sont impliquées dans le transport pH-dépendant des métaux divalents incluant le  $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$  (Supek *et al.*, 1996; Gunshin *et al.*, 1997). La fonction immunologique de Nramp-1 n'est pas clairement élucidée. Nramp-1 semble inhiber la croissance bactérienne dans les tissus du système réticuloendothélial durant les premières phases de l'infection. Son mécanisme d'action serait la modulation cytotocidale des macrophages en augmentant la production de l'oxyde nitrique, la fusion phagolysosomale, la production de cytokines et l'expression des molécules CMH II (Zekarias *et al.*, 2002). Le lien entre le polymorphisme de Nramp-1 et les différences dans la mortalité des poulets infectés à *Salmonella* a été établi (Hu *et al.*, 1995). Il existe au moins onze variations de séquences dans le gène Nramp-1 qui sont intimement associées à des différences dans la résistance aux salmonelloses (Hu *et al.*, 1997).

### **3. 3. 3. 1. Les récepteurs TLR (Toll like receptor)**

Les récepteurs TLRs des mammifères appartiennent à la famille de la protéine Toll de *Drosophila* qui est impliquée dans le développement embryonnaire et la réponse immunitaire des mouches adultes (Janssens et Beyaert, 2003). Les TLRs se



comportent comme les récepteurs de l'IL-1. Ils déclenchent les mêmes cascades de signalisation dans la cellule en activant les NF- $\kappa$ B. L'induction de l'expression des gènes dépendant de NF- $\kappa$ B est importante dans le développement de la réponse inflammatoire.

Les TLRs peuvent être spécifiques à plusieurs ligands microbiens. Le LPS des bactéries activent les macrophages en se fixant aux récepteurs CD14 qui interagissent avec d'autres molécules, dont les plus importantes sont les TLRs, pour induire des signaux à travers les membranes cellulaires.

Les TLRs jouent un rôle important dans la réponse de l'hôte aux pathogènes. Plusieurs facteurs semblent affecter l'expression des TLRs par les macrophages. Le facteur génétique lié au polymorphisme du locus des TLRs fait que des individus génétiquement différents expriment des niveaux différents de TLRs. Aussi, l'expression des TLRs diminue avec l'âge des individus, ce qui expliquerait la susceptibilité des personnes âgées aux infections (Janssens et Beyaert, 2002). Il s'est également avéré que les cytokines proinflammatoires et les produits bactériens pouvaient augmenter l'expression des TLRs, alors que les cytokines anti-inflammatoires avaient un effet inverse (Muzio *et al.*, 2000).

Les monocytes et les macrophages sont des sites majeurs de l'expression des TLRs chez les oiseaux et les mammifères (Dil et Qureshi; 2002, Zarembek et Godowski, 2002). Plusieurs études ont démontré que les TLRs sont impliqués dans la

réponse inflammatoire des poulets. En effet, les TLRs permettent aux hétérophiles aviaires de reconnaître les ligands bactériens, tels que les LPS et les LTA (Lipoteichoïque acid), et déclenchent par la suite des signaux de transduction qui induisent la réponse oxydative chez les hétérophiles (Farnell *et al.* 2003a et 2003b). Dil et Qureshi (2002) ont démontré que les différences observées chez différentes lignées de macrophages dans l'expression de iNOS sont liées, en partie, aux différences dans l'expression du TLR4. Selon Laveque *et al.*, (2003), la protéine TLR4 des poulets, identique à 46% à celle de l'humain, est impliquée dans la résistance des poulets aux infections à *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium.

Les TLR2 sont également présents dans tous les organes des poulets et ils sont capable de répondre aux bactéries *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* et *Mycobacterium bovis* (Fukui *et al.*, 2001)

### 3. 1. 4. Cytokines

Les cytokines sont des polypeptides et des glycopeptides de faibles poids moléculaires. Ce sont des médiateurs produits par plusieurs types de cellules (principalement les lymphocytes et les macrophages activés, mais aussi les cellules endothéliales, épithéliales et connectives).

Les cytokines sont impliquées dans divers processus physiologiques et pathologiques et dans le contrôle du système immunitaire en modulant la fonction des autres types de cellules. Les cytokines déterminent le type et l'importance de la

réponse immunitaire générée soit par un micro-organisme pathogène ou par un vaccin. Selon les cytokines produites, la réponse immunitaire protectrice induite est soit à médiation cellulaire (Th1) ou humorale (Th2) (Kuby, 1997).

La plupart des cytokines sont synthétisées en réponse à divers stimuli incluant des agents infectieux ou leurs produits dérivés (endotoxine), des médiateurs inflammatoires, des lésions mécaniques et les cytokines elles-mêmes. Les cytokines se fixent de façon spécifique aux ligands des récepteurs sur la surface des cellules cibles; elles génèrent par la suite un signal intracellulaire de transduction et une voie messagère secondaire. A cause de leur grande affinité aux récepteurs, les cytokines sont de puissantes molécules effectrices agissant à des concentrations de picomolaire et femtomolaire.

Les cytokines induisent des réponses cellulaires à travers des activités autocrine, paracrine et parfois endocrine. Une cytokine donnée peut avoir plusieurs activités biologiques (pléiotropiques), réciproquement des cytokines antigéniquement différentes peuvent avoir des activités similaires ou identiques (redondantes). Les cytokines régulent l'activité cellulaire en réseau ou en cascade interactive coordonnée dans lequel la libération d'une cytokine entraîne la production et la sécrétion d'une série d'autres cytokines conduisant soit un réseau rétroactif « feedBack » positif ou négatif.

La diversité des fonctions des cytokines démontre leur importance. Une fois fixées sur les cellules cibles, les cytokines peuvent aussi bien induire une variété d'effets sur le comportement des cellules (différentiation, production de nouveaux récepteurs et production de protéines) que de les inhiber. Une production excessive ou insuffisante d'une ou des cytokines peut contribuer à la pathophysiologie de la maladie. Cependant les cytokines jouent un rôle important dans aussi bien la régulation de l'inflammation que de l'immunité.

La classification des cytokines est en général arbitraire. La nomenclature n'est en effet basée sur aucune relation systématique entre protéines, elle est très complexe et porte parfois à confusion. Les cytokines ont été regroupées soit en fonction de leur provenance (cellules sources), dans ce cas on parle de lymphokines et monokines si elles sont produites respectivement par des phagocytes mononucléaires et des lymphocytes. Mais le plus souvent, les cytokines ont été classées en fonction de leurs rôles fonctionnels dans la régulation inflammatoire et immune (Kuby, 1997).

**Les interleukines :** Elles regroupent des protéines hétérogènes qui n'ont en commun que leur nom, elles régulent l'interaction entre les lymphocytes et les autres leucocytes.

**Les interférons (IFN):** Ce sont des glycoprotéines qui sont synthétisées en réponse à une infection virale, à une stimulation immunitaire ou à une variété de

stimulations chimiques. Les interférons inhibent la réplication des virus en interférant avec l'ARN viral et la synthèse des protéines.

**TNF (tumor necrosis factors) :** Comme leur nom l'indique, elles ont l'habilité de causer la mort programmée des cellules tumeurs. Il y a celles qui dérivent des macrophages et d'autres des lymphocytes T.

**Facteurs de croissance (Growth factors) :** Ils stimulent la croissance des cellules et assurent au corps une quantité suffisante de cellules nécessaires à la défense.

**Les chimiokines :** Ces cytokines sont des petites protéines qui attirent différents leucocytes vers le site d'infection. De plus, elles régulent l'expression et la conformation des intégrines dans les membranes des leucocytes. Les chimiokines peuvent être subdivisées en deux groupes en se basant sur la position de deux des quatre résidus cystéines conservées. Le sous-groupe C-C qui inclut les MIP « macrophage inflammatory protein » et le sous-groupe C-X-C qui inclut l'IL-8

La caractérisation des cytokines a été difficile à cause de leurs origines diffuses et leur action souvent localisée, néanmoins elles ont été l'objet de recherches intenses chez les mammifères à cause de leur implication dans l'étiologie d'une variété de

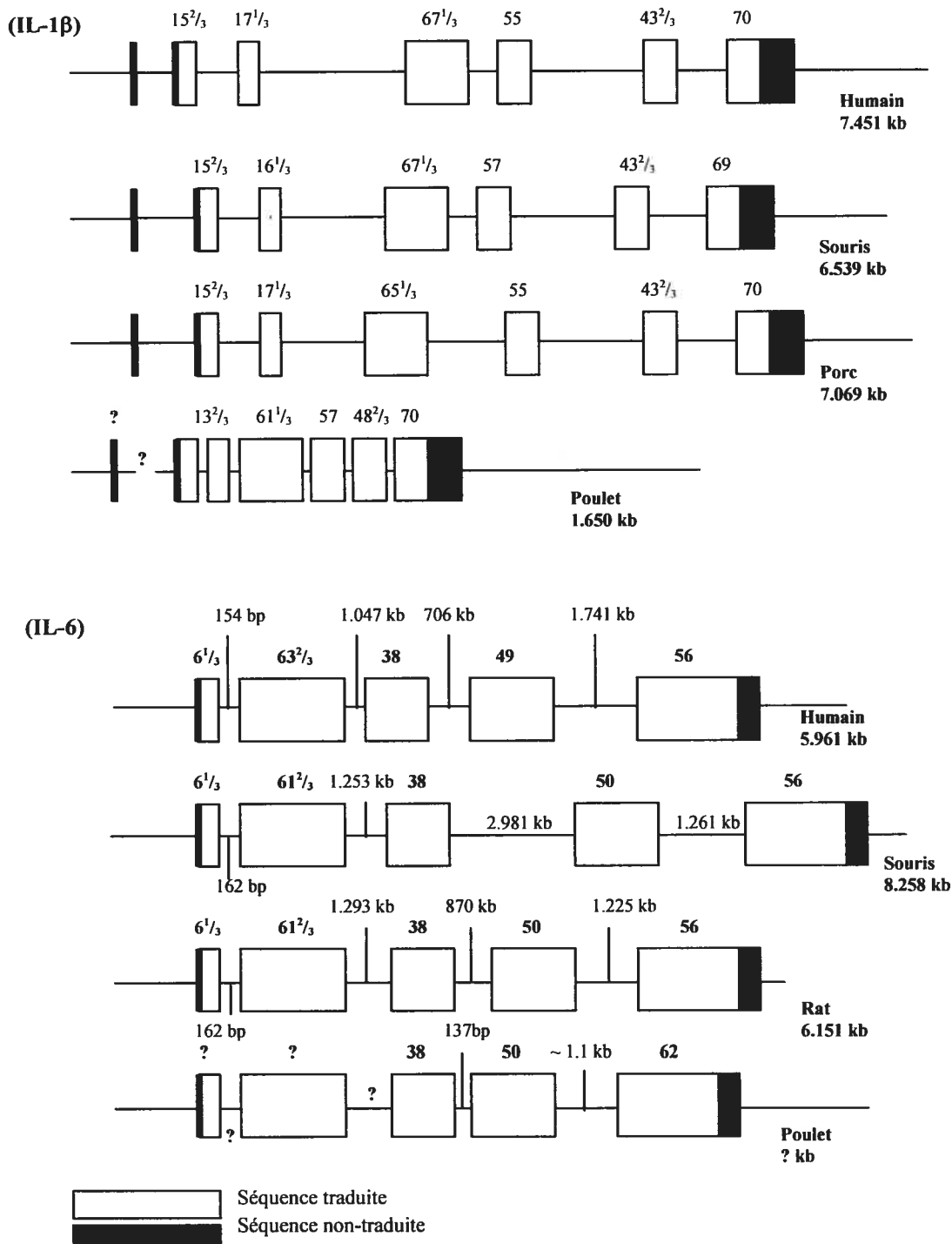
processus fondamentaux à savoir l'homéostasie et la maladie, ainsi que dans la régulation de la réponse immune.

Chez les mammifères plusieurs cytokines, avec des fonctions biologiques bien définies, ont été identifiées et caractérisées. Par contre, chez les oiseaux, bien que des équivalences biologiques avec des cytokines des mammifères aient été établies, peu d'entre elles ont été purifiées et caractérisées (Staheli *et al.*, 2001). Les gènes des cytokines aviaires clonés et séquencés sont représentés dans le Tableau 2.

Cinq cytokines aviaires IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15 et IL-18 ont fait l'objet d'une étude approfondie (Kaiser *et al.*, 2001). La caractérisation de ces gènes a montré qu'ils partageaient certaines similarités avec ceux des cytokines des mammifères. En effet, bien que la longueur des gènes des cytokines aviaires soit plus courte que celle de leur homologue chez les mammifères, ils codaient pour, à peu près, le même nombre d'acides aminés. La longueur du gène de l'IL-1 $\beta$  aviaire représente le quart de celle de leur équivalent chez les mammifères. La présence d'un exon non-traduit à l'extrémité 5' du gène de IL-1 $\beta$  aviaire n'a pas encore été démontrée (Figure 5). De même, bien que la majorité de la structure du gène de l'IL-6 aviaire ait été déterminée, la région 5' reste encore inconnue (Figure 5).

**Tableau 2. Les gènes des cytokines clonés des différentes espèces aviaires (Sharma, 2003)**

Gènes des cytokines clonés	Espèces aviaires
IFN- $\alpha$	Poulet, dinde, canard
IFN- $\beta$	Poulet
IFN- $\lambda$	Poulet, dinde, caille Japonaise, pintade, canard
IL-1 $\beta$	Poulet,
IL-2	Poulet, dinde
IL-6	Poulet
IL-8	Poulet
IL-12	Poulet
IL-15	Poulet
IL-16	Poulet
IL-18	Poulet
SCF « Stem cell factor »	Poulet
MGF	Poulet
TGF $\beta$	Poulet
Lymphotactine	Poulet
MIP-1 $\beta$	Poulet
Chimiokines (K60, K203)	Poulet



**Figure 5 :** Comparaison entre les structures des gènes de IL-1 $\beta$  et de IL-6 aviaires avec celles des gènes de IL-1 $\beta$  et de IL-6 des mammifères (la même échelle est utilisée pour tous les gènes) (adaptée de Kaiser *et al*, 2001)



L'utilisation des cytokines dans les élevages aviaires apparaît comme une méthode alternative pour contrôler la maladie (Hilton *et al.*, 2002). L'efficacité de la thérapie à base de cytokines a été démontrée chez l'homme et les animaux. Le facteur limitant majeur de l'utilisation des cytokines est leur faible persistance *in vivo* qui est due à leur rapide utilisation et/ou dégradation. L'utilisation des vecteurs viraux a permis de prolonger la durée de la disponibilité des cytokines *in vivo* chez les poulets.

Les cytokines aviaires semblent être de bonnes candidates pour une utilisation comme adjuvants de vaccin. Lowenthal *et al.* (1998) avaient démontré que la co-administration de l'IFN- $\gamma$  recombinant de poulet avec les globules rouges de mouton (antigène) chez les poulets augmentait les réponses en immunoglobulines G primaires et secondaires qui persistaient à des niveaux élevés et durant une longue période comparée à celles produites chez les poulets qui avaient reçu l'antigène sans l'adjuvant. En plus, en présence de l'IFN- $\gamma$ , les quantités d'antigènes dans le vaccin peuvent être diminuées. Les cytokines pourraient éventuellement remplacer les adjuvants à base d'huiles qui, souvent, induisent des réactions au niveau des sites d'injection et par conséquent, affectent la qualité de la viande (Lowenthal *et al.*, 1999).

L'IFN- $\gamma$  peut également promouvoir la croissance des poulets. L'administration de l'IFN- $\gamma$  aux poulets empêche non seulement la perte de poids associée à l'infection coccidiale mais augmente également le taux de gain de poids chez les poulets convalescents (Lowenthal *et al.*, 1997).

### 3. 1. 4. 1. Les cytokines pro-inflammatoires

Une cascade d'événements non-spécifiques (réponse de la phase aiguë) est déclenchée par une infection microbienne ou une lésion. La réponse de la phase aiguë est initiée après l'activation des cellules phagocytaires locales et les cellules non-immunes (fibroblastes et épithéliales) pour produire des cytokines pro-inflammatoires IL-1, IL-6, et IL-12 et TNF- $\alpha$ . Ces cytokines agissent de façon synergique pour induire une réponse locale et systémique aux stimuli. Les réponses locales initiées par la production des cytokines pro-inflammatoires sont : (a) l'augmentation de la perméabilité vasculaire, (b) l'expression des molécules d'adhésion sur l'endothélium vasculaire, et (c) l'induction des chimiokines, ie. IL8 qui attirent la population des leucocytes spécifiques vers le site. Les réponses systémiques induites par les cytokines sont, en autres, la fièvre, la production protéines hépatique de la phase aiguë, et la sécrétion de CSF (colony stimulating factors) par les cellules endothéliales. Ces réponses vont entraîner une hématopoïèse et une augmentation transitoire du nombre de cellules importantes dans la lutte contre l'infection. L'activité fonctionnelle des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, IL-8, et TNF) a été démontrée chez le poulet. Le clonage de ces cytokines a révélé peu d'homologie avec celles des mammifères (Staheli *et al.*, 2001).

Chez la souris, deux familles principales de cytokines (Th1 et Th2) déterminant la nature de la réponse immunitaire, sont produites par les cellules T (CD4+). Les

cytokines Th1, qui englobent IFN $\gamma$ , IL-2 et IL-12, induisent une réponse à médiation cellulaire. Par contre les cytokines Th2, qui regroupent IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 et IL-13, stimulent la réponse humorale. Chez le poulet, la majorité des cytokines caractérisées, à l'exception de IL-6, appartiennent au groupe Th1. Les homologues des cytokines du groupe Th2, à savoir IL-4, IL-5 et IL-10, ne sont pas encore identifiés chez le poulet. L'existence de la dichotomie Th1/Th2 telle que décrite chez les mammifères n'est pas encore confirmée (Hilton *et al.*, 2002).

### **3. 2. Le processus inflammatoire chez les oiseaux**

La réponse inflammatoire chez les espèces aviaires se rapproche beaucoup plus de celle des reptiles que de celle des mammifères (Montali, 1988). Les médiateurs inflammatoires exacts élaborés dans les premières étapes de l'inflammation ainsi que leurs sources ne sont pas clairement identifiés chez les oiseaux. Les hétérophiles du poulet et de la dinde démontrent une activité chimiotactique envers plusieurs facteurs dont l'endotoxine et le plasma activé au zymozan. De même les facteurs chimiotactiques sont générés par les bactéries (*Staphylococcus aureus* ou *Pasteurella multocida*) mélangées avec du sérum (Latimer *et al.*, 1990; Andreasen *et al.*, 1993).

La migration des cellules inflammatoires hors de la circulation sanguine en réponse à une variété d'immunogènes a été décrite chez les poulets. Elle semble être similaire à celle des mammifères (Vegad et Katiyar, 1995). Très tôt, environ trente minutes après l'introduction de l'immunogène, les leucocytes se collent aux parois

des veinules. La migration des hétérophiles et des monocytes à travers les veinules se fait de façon concurrentielle, quoi que la proportion des deux populations est immunogène-dépendante. Dans le tractus respiratoire aviaire, du fait de l'absence des macrophages résidents, l'influx des hétérophiles est considéré comme la première ligne de défense cellulaire (Toth et Siegel, 1986; Ficken et Barnes, 1989).

Les basophiles arrivent aussi très tôt dans le site d'inflammation et pourraient être importants dans la régulation subséquente des changements cellulaires. À 12 heures postinfection, les lymphocytes commencent à immigrer vers le site inflammatoire et quelques macrophages fusionnent pour former des cellules géantes. L'agrégation et la prolifération des lymphocytes dans le péri-vasculaire entraînent la formation de foyers lymphoïdes qui doivent jouer le même rôle que les ganglions lymphatiques des mammifères, puisque les ganglions lymphatiques sont absents chez les oiseaux. Les hétérophiles désintégrés sont phagocytés par les macrophages qui finissent par dominer dans le site. En quelques jours, les macrophages forment un syncytium autour de la zone de l'immunogène et de concert avec les fibroblastes et la fibrine, ils encerclent le site pour former un granulome (Klasing, 1991).

Ce qui caractérise la réponse inflammatoire des oiseaux est la rapidité avec laquelle elle se développe. Le processus de la réaction aiguë se déclenche dès la première heure qui suit l'agression, alors qu'il faut attendre au minimum quatre heures pour observer les mêmes signes chez les mammifères. Quant à l'inflammation subaiguë, elle s'installe en moins de 24 heures chez les oiseaux alors qu'il faut au

moins trois jours pour avoir la même réaction chez les mammifères (Frédette et Boulianne, 1994).

Chez les oiseaux, la pathogenèse des lésions, liée à l'infiltration des hétérophiles aux sites d'infection, diffère de celle induite par les neutrophiles chez les mammifères (Montali, 1988). Chez les oiseaux, la réaction inflammatoire induite par une infection est de type caséux. Le pus crémeux et liquéfié, caractéristique de la réponse suppurative typique chez les mammifères, n'existe pas chez les oiseaux et les reptiles.

### **III. MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS**

**ARTICLE 1 :**

**Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to  
serum and in pathogenicity**

Manuscrit publié dans "Infection and immunity"

2003, 71 (1): 536-540

**Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity**

Melha Mellata,<sup>1</sup> Maryvonne Dho-Moulin,<sup>2</sup> Charles M. Dozois,<sup>3</sup><sup>⊗</sup> Roy Curtiss III,<sup>3</sup> Peter K. Brown,<sup>3</sup><sup>φ</sup> Pascal Arné,<sup>2</sup><sup>#</sup> Annie Brée,<sup>2</sup> Clarisse Desautels,<sup>1</sup> And John M. Fairbrother<sup>1</sup><sup>\*</sup>

Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada<sup>1</sup>, UR86, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly, France<sup>2</sup>, Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri 63130<sup>3</sup>

<sup>⊗</sup>Present address: INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada

<sup>φ</sup>Present address: 1A Champion Road, Gladesville NSW 2111 Australia

<sup>#</sup>Present address: Laboratoire d'Epidémiologie et d'Analyse des risques, Ecole Nationale Vétérinaire, 94704 Maisons-Alfort, France

<sup>\*</sup>Corresponding author. Mailing address: Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada. Phone : (1) 450 773 8521 ext. 8234. Fax (1) 450 778 8108. E-mail: [john.morris.fairbrother@UMontreal.CA](mailto:john.morris.fairbrother@UMontreal.CA).



## SUMMARY

In chickens, colibacillosis is caused by avian pathogenic *E. coli* (APEC) via respiratory tract infection. Many virulence factors, including type 1 (F1A) and P (F11) fimbriae, curli, aerobactin, K1 capsule, and temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) and plasmid DNA regions have been associated with APEC. A strong correlation between serum resistance and virulence has been demonstrated, but roles of virulence factors in serum resistance have not been well elucidated. By using mutants of APEC strains TK3, MT78, and  $\chi$ 7122, which belong to serogroups O1, O2, and O78, respectively, we investigated the role of virulence factors in resistance to serum and pathogenicity in chickens. Our results showed that serum resistance is one of the pathogenicity mechanisms of APEC strains. Virulence factors that increased bacterial resistance to serum and colonization of internal organs of infected chickens were O78 lipopolysaccharide of *E. coli*  $\chi$ 7122, and the K1 capsule of *E. coli* MT78. In contrast, curli, type 1, and P fimbriae did not appear to contribute to serum resistance. We also showed that the *iss* gene, which was previously demonstrated to increase resistance to serum in certain *E. coli* strains, is located on plasmid pAPEC-1 of *E. coli*  $\chi$ 7122 but does not play a major role in resistance to serum for strain  $\chi$ 7122.

## INTRODUCTION

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) belongs to the extraintestinal pathogenic group of *E. coli*. These bacteria cause airsacculitis, omphalitis, peritonitis, salpingitis, synovitis, and colisepticemia in poultry (17). APEC is also associated with cellulitis or necrotic dermatitis of the lower abdomen and thighs, and with granuloma. APEC strains belong predominantly to three serogroups, O1, O2, and O78. Virulence factors associated with APEC strains include type 1 and P fimbriae, curli, aerobactin, K1 capsule, and temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) of the autotransporter family (9, 17). Serum resistance also appears to be an important virulence mechanism of APEC, and it may play a major role in the pathogenesis of avian colibacillosis. For instance, serum-resistance has often been associated with isolates from septicemic turkeys and chickens (13, 33), and a correlation between serum resistance and virulence and lethality in isolates from septicemic chickens and turkeys has been observed (13, 15, 17).

At this time, it is not known if avian *E. coli* differ from mammalian isolates in their mechanisms of serum resistance and virulence. Studies carried out on mammalian *E. coli* showed that many virulence factors, such as capsules, lipopolysaccharide (LPS), and outer membrane proteins (OMPs), including OmpA and ColV plasmid-encoded proteins TraT and Iss are associated with complement resistance of *E. coli* (17). TraT is a surface exclusion protein encoded by conjugative plasmids (32), and Iss is a plasmid-encoded OMP homologous to the Bor protein of

bacteriophage  $\lambda$  (32). In APEC, the role of different virulence factors in serum resistance has generally been speculative. Nolan *et al.* (22) produced an avirulent, complement-sensitive mutant from a virulent, complement-resistant APEC isolate. It differed from the wild-type strain in its OMP profile. Further characterization of this mutant suggested that the complement-resistance of this isolate was due, at least in part, to its ability to restrict C3 deposition, but not to degrade C3, on the bacterial surface (19).

To clarify the role of different virulence factors in the pathogenicity of APEC, various mutants have been constructed (Table 1) and, in some cases, tested in infection studies with chickens. PA68 (*fimH*) (2) and DM34 (*fim*) (20) mutants of O2:K1 strain MT78 that no longer produce the type 1 fimbrial adhesin FimH or type 1 fimbriae, respectively, and strain  $\chi$ 7273 (*tsh*), an isogenic derivative of O78:K80 strain  $\chi$ 7122 that no longer produces the pAPEC-1 plasmid-encoded Tsh autotransporter (12), colonized internal organs of inoculated chickens to the same extent as their wild-type parent strains (2, 12, 20). By contrast, the pAPEC-1 cured derivative of strain  $\chi$ 7122,  $\chi$ 7274, persisted less than its wild-type parent in internal organs (12).

This report examines the specific contribution of P fimbriae, K1-capsule, and O78 LPS to colonization of internal organs of inoculated chickens by APEC strains and investigates the role of these and other virulence factors in serum-resistance, by

using mutants of three APEC strains belonging to the most predominant serogroups (O1, O2, and O78).

**Bacterial strains and growth conditions.** The strains used in this study are listed in Table 1. In order to obtain APEC strain  $\chi$ 7122 derivatives that express other O-antigens instead of the native O78 antigen, strain  $\chi$ 7179 a O78<sup>-</sup> histidine-requiring (*hisG::Tn10*) auxotroph of strain  $\chi$ 7122 (Table 1), was used as the recipient for bacteriophage P1 *clm clr100*-mediated transduction. Since *hisG* is closely linked to the *rfb* O-antigen encoding DNA region, some transduced derivatives would acquire both prototrophy and an O-antigen-encoding *rfb* gene cluster. Briefly, P1 phage lysates of strains  $\chi$ 6206 (O26) and  $\chi$ 7112 (O1) were used to transduce strain  $\chi$ 7179 as previously described (7). Transductants were selected for prototrophy by growth on minimal medium containing glucose, and loss of tetracycline resistance conferred by *Tn10* was verified. O-antigen-positive clones were confirmed by slide agglutination with O-antigen-specific antisera using standard slide and tube agglutination techniques (24). The O1- and O26- expressing derivatives of strain  $\chi$ 7179 were named  $\chi$ 7193 and  $\chi$ 7168 respectively.

A cosmid library constructed in pHC79, representing the genome of MT78 was screened by PCR to identify clones carrying the *kps* region (17 kb). A positive cosmid (p2D12) was identified, and was transferred by electroporation into BEN2694, generating strain BEN2700. The restoration of the K1 capsule in the complemented strain BEN2700 was demonstrated by the Wellcogen *N. meningitidis*

B/*E. coli* K1 kit (Murex Biotech Limited) and lysis by K1-specific bacteriophage (data not shown).

Lennox broth and Lennox agar (21) were routinely used for growing *E. coli* and clones. For infection studies, strains were grown in brain heart infusion broth (Difco). Ampicillin ( $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), kanamycin ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), chloramphenicol ( $25 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), nalidixic acid ( $12.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ ), and tetracycline ( $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) were used as required at the indicated concentrations unless stated otherwise. For the  $\text{Nal}^r$  strains  $\chi 7122$  and MT78, no significant difference in virulence was observed between the parent strains ( $\text{Nal}^s$ ) and their respective  $\text{Nal}^r$  derivatives in experimentally infected chickens (Data not shown).

**Bactericidal effect of serum.** To identify virulence factors contributing to serum resistance, three APEC strains, their different mutants, and a control strain (862) (Table 1) were evaluated for their resistance to serum by examination of bacterial survival following a 3-hour incubation in 90% serum from specific-pathogen-free chickens as previously described (13). The absence of specific antibodies for the APEC strains used in this study was confirmed by agglutination. A strain was considered serum resistant if the bacterial count increased or did not change during the 3-h incubation and serum-sensitive if a decrease of more than 2 orders of magnitude in the bacterial count was observed. Results are presented as mean of results of more than three experiments. Turkey's test was performed with commercially available Software (SAS 8.1) (SAS Institute, Inc., Cary, N. C.) and

post hoc 2-by-2 comparisons were done to assess differences between the strains. Our results confirmed that the three APEC strains MT78,  $\chi$ 7122, and TK3 were serum resistant (12, 29), whereas the nonpathogenic control strain 862 was serum sensitive (Fig. 1) (data for TK3 strain not shown). Significant differences in serum resistance between all APEC strains and the nonpathogenic control strain were observed from 1 h after inoculation ( $P < 0.0001$ ). Sensitivity of the K1 mutant BEN2694 and resistance of its complemented strain BEN2700 to serum (Fig. 1A) demonstrated the role of K1 capsule in resistance of strain MT78 to serum. Furthermore, the growth of the K1-mutant in complement-inactivated serum showed more definitively that the K1 capsule interacted with complement (Data not shown). Polysaccharidic capsules of *E. coli* may interact with C3b activators in the classical and alternative complement pathways, resulting in resistance of the bacteria to the bactericidal effects of complement. For instance, serum resistance of avian isolates has often been associated with the presence of K1 capsule. In fact, Pourbakhsh et al. (29) demonstrated a correlation between the presence of K1 capsule and bactericidal effects of serum in APEC strains. Our results confirm the role of K1 capsule in serum resistance.

The absence of O78 antigen in  $\chi$ 7145 rendered this strain serum sensitive, and transformation of this strain with pYA3255, which encodes O78 LPS, rendered it as resistant to serum as wild-type strain  $\chi$ 7122 (Fig. 1B). On the other hand, the derivatives  $\chi$ 7193 (O1), and  $\chi$ 7168 (O26) were serum sensitive (Fig. 1B). Serum resistance can be mediated by particular O-antigen polysaccharide side chains (31).

Resistance to the action of the membrane attack complex is often observed when bacteria change from a rough to a smooth phenotype. LPS of gram-negative bacteria are closely associated with the major OMPs (porins) (25, 30). It is probable that the length of the LPS chains determines the accessibility of complement to bacterial components such as porins and that effectiveness of complement fixation is also related to the nature of the LPS sugars. Nevertheless, the presence of long-chain smooth LPS is not sufficient for serum resistance in all O serotypes. In the present study, substitution of O78 with O1 or O26 antigen rendered the strain serum sensitive. Similarly, by testing different O serotypes, Pluschke et al. (28) and Pluschke and Achtman (27) showed that O1 polysaccharide did not contribute to serum resistance of an *E. coli* K1-positive strain. In fact, it fixed complement more efficiently than did isolated O7- or O18- LPS. By extrapolation, we can suppose that the O1 LPS alone does not protect the APEC strain TK3 (O1: K1) against the bactericidal effect of serum. Our results demonstrate that K1 capsule is not always needed for serum resistance, since strain  $\chi$ 7122 expressing O78 LPS was serum resistant even though it does not express K1 capsule. Also, as observed for strain  $\chi$ 7193, contrary to the case with O78 LPS, O1 LPS did not protect against the bactericidal effect of serum. Thus, the K1 capsule is probably required to prevent complement-mediated lysis of strains carrying certain O LPS antigens, such as O1 and O2, but is not needed to protect strains producing O LPS such as O78, which would provide a protective role similar to that of K1 capsule.

Serum resistance of APEC strains has also been associated with the presence of type 1 fimbriae (13, 33). In contrast, our results showed that in the absence of FimH or type 1 fimbriae, the two mutant strains PA68 and DM34, remained serum resistant. Also, in spite of the presence of FimH and type 1 fimbriae, the mutant BEN2694 (K) was serum-sensitive (Fig. 1A). Hence, type 1 fimbriae do not appear to be important in serum resistance, at least for strain MT78. Similarly, it appears that the PapG adhesin of P fimbriae is not involved in serum resistance, since mutant TK37G remained resistant to the bactericidal effect of serum (data not shown).

Although curli bind to serum proteins (23), our results show that they do not contribute significantly to serum resistance, since inactivation of *csgA*, which encodes the curli subunit, did not affect resistance of strain  $\chi$ 7122 to serum (data not shown). Also, we have confirmed that *tsh* and plasmid pAPEC-1 do not contribute significantly to complement resistance of  $\chi$ 7122 (12).

**Detection of *iss* and *traT* by PCR.** The *iss* and *traT* genes were amplified by PCR as previously described (18; H. Dezfollian, personal communication). Briefly, the DNA crude extracts prepared by a rapid boiling method were tested in a 25- $\mu$ l PCR mixture containing 12.5 pmol (or 6.25 pmol each) of the forward and reverse primers, 5 nmol of each deoxynucleoside triphosphate, and 1 U of *Taq* DNA polymerase in 1  $\times$  buffer. The PCR conditions were as follows: after initial incubation at 95°C for 5 min, temperature cycling was initiated with each cycle as follows: 94°C for 46 s, 63°C (*traT*) or 50°C (*iss*) for 46 s, and 72°C for 46s for 24 cycles in a PTC-



200 Peletier thermal cycler (MJ Research, Inc.). Samples were separated in 2% agarose gels and revealed with ethidium bromide. The sizes of the amplicons were determined by comparing them with a 100-bp DNA Ladder (Gibco). The three APEC wild-type strains,  $\chi$ 7122, MT78, and TK3, and all mutant strains used in this study (Table 1), with the exception of the pAPEC-1 plasmid-cured derivative  $\chi$ 7274, were *iss* and *traT* positive as demonstrated by PCR. Strain  $\chi$ 7274 was *iss* negative but *traT* positive. The nonpathogenic control strain 862 was *iss* and *traT* negative. Many OMPs (TraT, OmpA, and Iss) have been associated with complement resistance of APEC isolates (26). In our study, the presence of *iss* and *traT* genes in strains which had lost K1 or O-serotype did not protect these bacteria against the bactericidal effect of serum. However, these strains were less sensitive than the control strain 862, which is *iss* and *traT* negative. Hence, Iss and TraT may play a limited role in the defense against serum killing, since it was suggested that the *iss* and *traT* products block the functioning of the terminal attack complex rather than its formation (5). The finding that *iss* was absent but *traT* was still present in the pAPEC-1 mutant  $\chi$ 7274 supported the hypothesis that the *iss* gene is located on the plasmid pAPEC-1, as has been already described for plasmid ColV, I-K94 (4, 5). However, in contrast to the finding of these authors, we found that the absence of *iss* in an APEC strain did not affect its resistance to complement. These results underline the multi-factorial nature of bacterial resistance to the bactericidal effects of serum.

**Experimental infection of chickens via the air sacs.** To study the involvement of the various virulence factors in pathogenicity, dissemination abilities

of three APEC strains and their corresponding mutant strains were compared in the respiratory tract and internal organs of chickens. Briefly, groups of 8 or 10 3.5-week-old White Leghorn specific-pathogen-free chickens from the Institut National de la Recherche Agronomique (INRA) experimental farm were inoculated with the appropriate strain into the right thoracic air sac as described previously (12). All birds were euthanatized at 48 h postinfection by injection of Nesdonal (Rhône-Mérieux, Lyon, France) and necropsied. Organs were aseptically removed, and macroscopic fibrinous lesions were scored. The left lung, liver, and spleen were weighed, suspended in phosphate-buffered saline, and homogenized with an Ultra-Turrax apparatus as previously described (11). Dilutions of homogenates were plated onto Drigalski agar with appropriate antibiotics for bacterial quantification, and 1 ml was incubated in brain heart infusion for qualitative detection of *E. coli*. The presence of *E. coli* was also determined in air sacs, pericardial fluid and blood. Lesion scores and bacterial counts in organs were compared between groups of chickens inoculated with the parent strain or its derivative(s) by analysis of variance. The exact Pearson's chi square test was used to compare the number of contaminated chickens in each group in the case of qualitative detection of *E. coli*. In our previous studies, mutant strains DM34 (*fim*), PA68 (*fimH*),  $\chi$ 7273 (*tsh*) persisted in internal organs as well as their corresponding wild-type strains (2, 12, 20), whereas  $\chi$ 7274 (pAPEC-1) persisted to a lesser extent than its wild-type parent strain (12). In this study, clinical signs of colibacillosis were reproduced with APEC strains  $\chi$ 7122, MT78, and TK3. Qualitative and quantitative results showed that all internal organs and fluids were colonized following inoculation of chickens with each of the three wild-type strains

(Tables 2 and 3). On the other hand, mutants  $\chi 7145$  (O78<sup>-</sup>) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>) persisted less well or did not multiply in body fluids (pericardial fluid and blood) and colonized less well, or did not colonize the internal organs (lungs, air sacs, spleen, and liver) in comparison to the corresponding parent strains. In contrast, no difference was noted in the ability of *papG* mutant TK37G to colonize internal organs and body fluids, compared with its corresponding parent strain. However, significant differences were apparent in lesion scores since the *papG* mutant induced less-severe lesions in the air-sacs and liver (Table 3) than the wild-type strain TK3. Complemented strain  $\chi 7145$  (pYA3255) (O78<sup>+</sup>) colonized internal organs and body fluids to the same extent as the wild-type strain, whereas the complemented BEN2700 (K1<sup>+</sup>) behaved in a manner similar to that of the corresponding mutant strain (Tables 2 and 3), in contrast to its behavior in the serum resistance experiments (Fig. 1A). This is possibly due to cosmid instability in vivo in the absence of antibiotic selection, as suggested by Brown and Curtiss (7). Also, we have observed that successive broth cultures of *E. coli* BEN2700 (K1<sup>+</sup>), in the absence of ampicillin selection, for longer periods than in the serum resistance experiments in which strain BEN2700 was complemented for, resulted in the loss of cosmid p2D12. The proportion of ampicillin-resistant clones decreased from 24hours ( $\Delta\log = -1.31$ ) to day 4 ( $\Delta\log = -4.9$ ) (Data not shown).

By using an intratracheal infection model in axenic chickens (6), we found that inactivation of *csgA*, which encodes the curli subunit, did not affect the ability of

strain  $\chi$ 7186 to induce lesions and colonize internal organs as compared to wild-type strain  $\chi$ 7122 tested in the same conditions (data not shown).

**Conclusion.** Taken together, our results show a correlation between serum resistance and the ability of bacteria to persist in body fluids and internal organs, since all bacteria when rendered serum sensitive were unable to infect internal organs. The use of mutant strains allowed us to demonstrate that the O78 LPS of strain  $\chi$ 7122, and the K1 capsule of strain MT78, are involved in the pathogenic process of these bacteria and that serum resistance is at least one mechanism used by these bacteria to reach internal organs of inoculated chickens. In contrast, the finding that the *papG* mutant strain TK37G induced less-severe lesions of airo-sacculitis and perihepatitis than the wild-type parent strain TK3 in infected chickens but nevertheless remained resistant to the bactericidal effect of serum, suggests that the PapG adhesin is involved in another mechanism of the pathogenic process of this strain. The involvement of these virulence factors in other pathogenic steps, such as resistance to phagocytosis, could be examined to further elucidate the pathogenic process and lead to better control measures for colibacillosis.

We thank Guy Beauchamp for assistance in statistical analyses and Hojabr Dezfullian for providing Iss primers. This work was supported by Formation des Chercheurs et à l'Aide de la Recherche du Québec (FCAR) grant 0214, and Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 2294 to J.M.F., and by U. S. Department of Agriculture National Research Initiative Competitive Grant Program grants 94-37204-1091, 97-35204-4512 and 00-35204-9224 to R.C., C.M.D., and P.B.

## REFERENCES

1. **Achtman, M., A. Mercer, B. Kusecek, A. Pohl, M. Heuzenroeder, W. Aaronson, A. Sutton, and R. P. Silver.** 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect Immun* **39**:315-35.
2. **Arné, P., D. Marc, A. Brée, C. Schouler, and M. Dho-Moulin.** 2000. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a *fimH* deletion. *Avian Dis* **44**:343-55.
3. **Ashkenazi, S., and T. G. Cleary.** 1989. Rapid method to detect shiga toxin and shiga-like toxin I based on binding to globotriosyl ceramide (Gb3), their natural receptor. *J Clin Microbiol* **27**:1145-50.
4. **Binns, M. M., D. L. Davies, and K. G. Hardy.** 1979. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* **279**:778-81.
5. **Binns, M. M., J. Mayden, and R. P. Levine.** 1982. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV,I-K94. *Infect Immun* **35**:654-9.

6. **Brée, A., M. Dho, and J. P. Lafont.** 1989. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Dis* **33**:134-9.
7. **Brown, P. K., and R. Curtiss III.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11149-54.
8. **Brown, P. K., C. M. Dozois, C. A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge, and R. Curtiss III.** 2001. *MlrA*, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica serovar* Typhimurium. *Mol Microbiol* **41**:349-63.
9. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**:299-316.
10. **Dho-Moulin, M., J. F. Van den Bosch, J. P. Girardeau, A. Brée, T. Barat, and J. P. Lafont.** 1990. Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect Immun* **58**:740-5.
11. **Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1

- (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis **38**:231-9.
12. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss III.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. Infect Immun **68**:4145-54.
  13. **Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bosse.** 1992. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. Infect Immun **60**:2648-56.
  14. **Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh, and J. M. Fairbrother.** 1995. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. Vet Microbiol **45**:297-309.
  15. **Ellis, M. G., L. H. Arp, and S. J. Lamont.** 1988. Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. Am J Vet Res **49**:2034-7.
  16. **Fairbrother, J. M., A. Broes, M. Jacques, and S. Lariviere.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. Am J Vet Res **50**:1029-36.



17. **Gross, W. B.** 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, pp.237-259. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and Man. CAB International, Wallingford, UK.
18. **Johnson, J. R., and A. L. Stell.** 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* **181**:261-72.
19. **Kottom, T. J., L. K. Nolan, M. Robinson, J. Brown, T. Gustad, S. M. Horne, and C. W. Giddings.** 1997. Further characterization of a complement-sensitive mutant of a virulent avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis* **41**:817-23.
20. **Marc, D., P. Arné, A. Brée, and M. Dho-Moulin.** 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a *fim-* mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**:473-85.
21. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual for *Escherichia coli* and related bacteria., Cold spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,, N.Y.

22. **Nolan, L. K., R. E. Wooley, C. W. Giddings, and J. Brown.** 1994. Characterization of an avirulent mutant of a virulent avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis* **38**:146-50.
23. **Olsèn, A., A. Jonsson, and S. Normark.** 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**:652-5.
24. **Ørskov, F., and I. Ørskov.** 1984. Serotyping of *E. coli*, p. 43-112. In N. J. R. Bergann T. (ed.), *Methods In Microbiology.*, New York.
25. **Pages, J. M., J. M. Bolla, A. Bernadac, and D. Fourel.** 1990. Immunological approach of assembly and topology of OmpF, an outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Biochimie* **72**:169-76.
26. **Pfaff-McDonough, S. J., S. M. Horne, C. W. Giddings, J. O. Ebert, C. Doetkott, M. H. Smith, and L. K. Nolan.** 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis* **44**:23-33.
27. **Pluschke, G., and M. Achtman.** 1984. Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 *Escherichia coli* differs with O antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns. *Infect Immun* **43**:684-92.

28. **Pluschke, G., J. Mayden, M. Achtman, and R. P. Levine.** 1983. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun* **42**:907-13.
29. **Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* **58**:195-213.
30. **Sen, K., and H. Nikaido.** 1991. Lipopolysaccharide structure required for *in vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J Bacteriol* **173**:926-8.
31. **Stawski, G., L. Nielsen, F. Ørskov, and I. Ørskov.** 1990. Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia coli* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon. *Apmis* **98**:828-38.
32. **Waters, V. L., and J. H. Crosa.** 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* **55**:437-50.
33. **Wooley, R. E., K. R. Spears, J. Brown, L. K. Nolan, and O. J. Fletcher.** 1992. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **36**:679-84.

**TABLE 1. Bacterial strains used in this study.**

<b>Strain</b>	<b>Genotype and characteristics<sup>a</sup></b>	<b>References</b>
$\chi$ 7122	APEC O78:K80:H9, <i>gyrA</i> Nal <sup>r</sup>	(7)
$\chi$ 7273	$\chi$ 7122 <i>tsh::tetAR</i> (B), Nal <sup>r</sup> Tc <sup>r</sup>	(12)
$\chi$ 7274	$\chi$ 7273 cured of virulence plasmid pAPEC-1, Nal <sup>r</sup>	(12)
$\chi$ 7179	O78-negative derivative of $\chi$ 7122 <i>hisG::Tn10 rfb</i>	(7)
$\chi$ 7186	$\chi$ 7122 curli-negative mutant; <i>csgA::cat</i> , Nal <sup>r</sup> , Cm <sup>r</sup>	(8)
$\chi$ 6206	Strain H30, O26:H11, SLT-1 <sup>+</sup>	(3)
$\chi$ 7168	$\chi$ 7179 <i>rfb</i> <sup>+</sup> (O26), prototroph by P1 $\chi$ 6206 lysate	This work
$\chi$ 7112	Strain A137, O1:K1:H7 ColV <sup>+</sup> isolate from human septicemia.	(1)
$\chi$ 7193	$\chi$ 7179 <i>rfb</i> <sup>+</sup> (O1), prototroph by P1 $\chi$ 7112 lysate	This work
$\chi$ 289	W1485 $\lambda^-$ <i>glnV44 F</i> <sup>-</sup>	(7)
$\chi$ 7145	$\chi$ 7122 ( $\chi$ 289: <i>hisG-zee</i> ), <i>rfb</i> deleted by replacement with <i>E. coli</i> K-12 region at 45 min	(7)
$\chi$ 7145(pYA3255)	Cosmid pYA3255 complements the <i>rfb</i> mutation in $\chi$ 7145	(7)
<b>MT78</b>	APEC O2: K1: H <sup>+</sup> , Nal <sup>r</sup>	(10)
<b>PA68</b>	MT78 ( <i>fimH</i> )	(2)
<b>DM34</b>	MT78 ( <i>fim</i> )	(20)
<b>BEN2694</b>	MT78 spontaneous K1-negative mutant, Nal <sup>r</sup>	This work
<b>BEN2700</b>	BEN2694 complemented with p2D12 (part of the <i>kps</i> cluster of MT78 cloned into pHC79), Nal <sup>r</sup> , Ap <sup>r</sup> , Tc <sup>r</sup>	This work

**Table 1. Bacterial strains used in this study (Cont.).**

<b>TK3</b>	APEC O1:K1:H7	(14)
<b>TK37G</b>	<i>papG</i> mutant of strain TK3 produced by allelic exchange using pKNG101 based suicide vector, Km <sup>R</sup>	C. Martin, personal communication
<b>862</b>	Serum-sensitive strain ( <i>E. coli</i> O115, K <sup>-</sup> , F165 <sup>-</sup> )	(16)

---

<sup>a</sup>Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol ; Km, kanamycin ; Nal, nalidixic acid ; Tc, tetracycline.

**Table 2: Abilities of APEC strains and various mutants to colonize respiratory organs, invade internal organs, and disseminate in body fluids.**

Strain	Inoculum (LogCFU)	fluid				Lung			Liver			Spleen			Blood		
		Air-Sacs	Pericardial	Presence of <i>E. coli</i>	Mean no. of bacteria <sup>b</sup>	Presence of <i>E. coli</i>	Mean no. of bacteria <sup>b</sup>	Presence of <i>E. coli</i>	Mean no. of bacteria <sup>b</sup>	Presence of <i>E. coli</i>	Mean no. of bacteria <sup>b</sup>	Presence of <i>E. coli</i>	Mean no. of bacteria <sup>b</sup>	Presence of <i>E. coli</i>	Mean no. of bacteria <sup>b</sup>	Presence of <i>E. coli</i>	Mean no. of bacteria <sup>b</sup>
$\chi$ 7122	7.1	9/10	10/10	10/10	3.9 ± 1.5	10/10	10/10	2.4 ± 1.2	10/10	10/10	2.9 ± 0.8	10/10	10/10	3.1 ± 0.4			
$\chi$ 7145	7.2	0/10 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c,d</sup>	2/10 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.8 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	2/10 <sup>c</sup>	2/10 <sup>c</sup>	0.4 ± 0.8 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c,d</sup>			
$\chi$ 7145 (pYA3255)	7.1	9/10 <sup>c</sup>	5/10 <sup>c</sup>	10/10	2.6 ± 1.1	9/10	1.8 ± 0.9	1.8 ± 0.9	10/10	10/10	2.1 ± 0.4	10/10	10/10	1.9 ± 0.7 <sup>c</sup>			
MT78	7.1	9/10	10/10	10/10	3.3 ± 0.9	10/10	2.8 ± 1.0	2.8 ± 1.0	10/10	10/10	3.2 ± 0.7	10/10	10/10	3.2 ± 0.5			
BEN2694	7.3	0/10 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	4/10 <sup>c</sup>	0.5 ± 0.7 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>			
BEN2700	7.3	1/10 <sup>c</sup>	1/10 <sup>c</sup>	0/10 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>	1/10 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.5 <sup>c</sup>	0.1 ± 0.5 <sup>c</sup>	2/10 <sup>c</sup>	2/10 <sup>c</sup>	0.2 ± 0.4 <sup>c</sup>	2/10 <sup>c</sup>	2/10 <sup>c</sup>	0.3 ± 0.7 <sup>c</sup>			
TK3	7.5	8/8	ND <sup>e</sup>	8/8	6.7 ± 0.9	8/8	4.1 ± 0.9	4.1 ± 0.9	8/10	8/10	4.6 ± 0.6	4/4	4/4	3.6 ± 0.6			
TK37G	7.3	8/8	ND	8/8	6.0 ± 1.6	7/8	4.1 ± 0.9	4.1 ± 0.9	8/10	8/10	4.6 ± 0.9	4/4	4/4	3.5 ± 0.1			

<sup>a</sup>Number of chickens demonstrating bacterial colonization/total number of chickens.

<sup>b</sup>Bacterial counts are presented as the mean log<sub>10</sub> CFU per gram (organs) or milliliter (body fluids) ± standard deviation for 8 or 10 birds from each group. Counts were carried out at 48 h post-inoculation in organs and pericardial fluid and at 6h post-inoculation with blood.

<sup>c</sup>Significant difference ( $P < 0.01$ ) versus wild-type strain

<sup>d</sup>Significant difference ( $P < 0.01$ ) versus complemented strain.

<sup>e</sup>ND, nondetermined

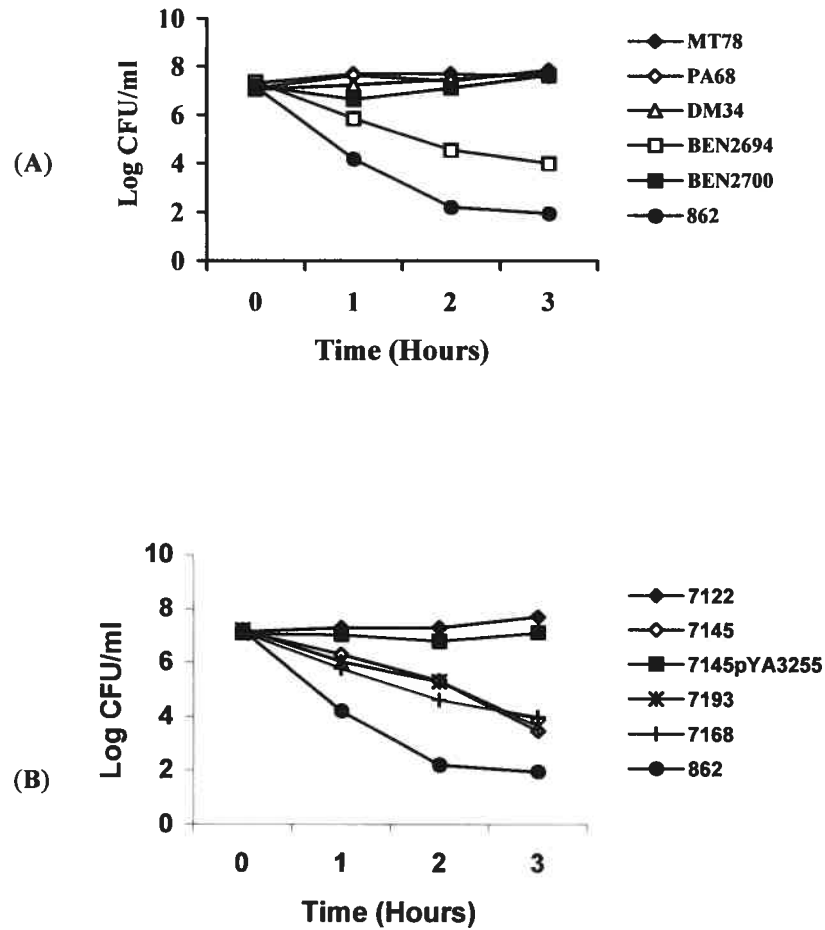
**Table 3. Production of inflammatory lesions in air-sacs and extrarespiratory organs of chickens inoculated with APEC strains and various mutants**

<b>Strain</b>	<b>Mean lesional scores in air-sacs<sup>a</sup></b>	<b>Mean lesional scores in heart and liver<sup>b</sup></b>
<b>χ7122</b>	2.7 ± 1.3	2.8 ± 0.4
<b>χ7145</b>	0.3 ± 0.5 <sup>c</sup>	0.2 ± 0.4 <sup>c</sup>
<b>χ7145(pYA3255)</b>	1.7 ± 0.8	2.5 ± 1.0
<b>MT78</b>	2.7 ± 0.9	2.2 ± 0.6
<b>BEN2694</b>	0.2 ± 0.6 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
<b>BEN2700</b>	0.2 ± 0.6 <sup>c</sup>	0 ± 0 <sup>c</sup>
<b>TK3</b>	3.5 ± 0.5	4.0 ± 0
<b>TK37G</b>	0.8 ± 0.8 <sup>c</sup>	1.5 ± 1.6 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Lesion scoring values for severity of aerosacculitis ± standard deviation: 0, normal; 1, slight edema; 2, mild diffuse thickening and neovascularization of air sacs with mild fibrinous exudate; 3, moderate fibrinous exudate; 4, severe extensive fibrinous exudate.

<sup>b</sup>Combined lesion scoring values for severity of pericarditis and perihepatitis ± standard deviation. Heart and pericardium: 0, normal; 1, vascularization, opacity, cloudy fluid in the pericardial cavity; 2, acute pericarditis. Liver: 0, normal; 1, slight amounts of fibrinous exudate; 2, marked perihepatitis.

<sup>c</sup>Significant difference ( $P < 0.01$ ) versus wild-type strain.



**FIG. 1.** Effect of 90% normal chicken serum on survival of strain MT78 and its mutants PA68 (*fimH*), DM34 (*fim*), and BEN2694 ( $K1^-$ ) and complemented strain BEN2700 ( $K1^+$ ) (A) and of strain  $\chi$ 7122 and its derivatives  $\chi$ 7145 ( $O78^-$ ),  $\chi$ 7193 ( $O1$ ), and  $\chi$ 7168 ( $O26$ ) and complemented strain  $\chi$ 7145 (pYA3255) ( $O78^+$ ) (B). Each point represents the mean for four to six experiments.



### **Contribution des auteurs à la réalisation de l'article 1.**

**Melha Mellata :** a conçu et réalisé les expériences de résistance au sérum et de PCR, a testé phénotypiquement et génotypiquement toutes les souches décrites dans ce manuscrit et a également analysé les résultats des expériences de l'*in vivo* et *in vitro* et a rédigé le manuscrit.

**Maryvonne Dho-Moulin :** a participé à la réalisation des tests de l'*in vivo* et a supervisé les travaux de P. Arné dans la construction du mutant BEN2694 et de la souche complémentée BEN2700, a également contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

**Charles Dozois :** a rédigé le 1<sup>er</sup> paragraphe de « Bacterial strains and growth conditions », a également contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

**Roy Curtiss III :** a supervisé les travaux de P. Brown dans la construction des souches  $\chi$ 7168 et  $\chi$ 7193, a également contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

**Peter K. Brown:** a construit les souches  $\chi$ 7168 et  $\chi$ 7193

**Pascal Arné :** a construit le mutant BEN2694 et la souche complémentée BEN2700.

**Annie Brée :** a participé à la réalisation des tests de l'*in vivo* décrits dans cet article.

**Clarisse Desautels:** a participé à la construction du mutant TK37G et à son test *in vivo*.

**John M. Fairbrother:** a supervisé les travaux de M. Mellata et l'a orientée dans l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections apportées au manuscrit.

**ARTICLE 2**

**Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial  
interaction with chicken heterophils and macrophages**

Manuscrit publié dans "Infection and immunity"


2003, 71 (1) : 494-503

**Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial  
interaction with chicken heterophils and macrophages**

MELHA MELLATA,<sup>1</sup> MARYVONNE DHO-MOULIN,<sup>2</sup> CHARLES M.  
DOZOIS,<sup>3#</sup> ROY CURTISS III,<sup>3</sup> BRIGITTE LEHOUX,<sup>1</sup> AND JOHN M.  
FAIRBROTHER<sup>1\*</sup>

Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada<sup>1</sup>, Pathologie  
Bactérienne, UR86, Institut National de la Recherche Agronomique, 37380 Nouzilly,  
France<sup>2</sup>, Department of Biology, Washington University, St. Louis, Missouri 63130<sup>3</sup>

# Present address : INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada H7V  
1B7

\*Corresponding author. Mailing address: Département de Pathologie et  
Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St.  
Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada. Phone : (1) 450 773 8521 ext. 8234. Fax (1)  
450 778 8108. 

## SUMMARY

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) cause extraintestinal disease in avian species via respiratory tract infection. Virulence factors associated with APEC include type 1 and P fimbriae, curli, aerobactin, lipopolysaccharide (LPS), K1 capsular antigen, temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh), and an uncharacterized pathogen-specific chromosomal region (the 0-min region). The role of these virulence factors in bacterial interaction with phagocytes was investigated by using mutants of three APEC strains, each belonging to one of the most predominant serogroups O1, O2, and O78. Bacterial cell interaction with avian phagocytes was tested with primary cultures of chicken heterophils and macrophages. The presence of type 1 fimbriae and, in contrast, the absence of P fimbriae, K1 capsule, O78 antigen, and the 0-min region promoted bacterial association with chicken heterophils and macrophages. The presence of type 1 and P fimbriae, O78 antigen, and the 0-min region seemed to protect bacteria against the bactericidal effect of phagocytes, especially heterophils. The tested virulence factors seemed to have a limited role in intracellular survival for up to 48 h in macrophages. Generally, opsonized and nonopsonized bacteria were eliminated to the same extent, but in some cases, unopsonized bacteria were eliminated to a greater extent than opsonized bacteria.

These results confirm the important role of type 1 fimbriae in promotion of initial phagocytosis, but nevertheless indicate a role for type 1 fimbriae in the protection of bacteria from subsequent killing, at least in heterophils. The results also indicate a role for K1 capsule, O78 antigen, P fimbriae, and the 0-min region in initial

avoidance of phagocytosis, but demonstrate an additional role for O78 antigen, P fimbriae, and the 0-min region in subsequent protection against the bactericidal effects of phagocytes after bacterial association has occurred.

## INTRODUCTION

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains cause extraintestinal disease in chickens, turkeys, and other avian species. The most common form of colibacillosis is characterized as an initial respiratory infection (airsacculitis), which is frequently followed by a generalized infection (perihepatitis, pericarditis, and septicemia). *E. coli* in poultry often enter the host by the respiratory tract. Sites of entry into the bloodstream are the gas-exchange region of the lung (2, 11, 46, 51) and the air sacs (46), which are relatively vulnerable to colonization and invasion by bacteria due to a lack of resident macrophages (56). Biological and environmental stresses such as viral or mycoplasma infections, overcrowding, and poor ventilation predispose birds to *E. coli* infections (23).

APEC strains belong to limited clones and serogroups, the most common and widespread serogroups being O1, O2, and O78 (7, 12, 17). Several potential virulence factors have been associated with APEC, including type 1 (F1A) and P (F11) fimbriae, curli, the aerobactin iron sequestering system, K1 capsular antigen, temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh), and resistance to the bactericidal effect of serum (13). Genetic approaches have identified additional regions of the chromosome likely to be associated with the virulence of APEC strains (8).

APEC strains adhere to chicken epithelial cells of the pharynx and trachea by means of type 1 fimbriae, comprising a major structural subunit, FimA, and a minor

subunit, FimH, that mediates the attachment to D-mannose residues (44). Type 1 fimbriae are mostly expressed by bacteria colonizing the trachea, lungs, and air sacs but not those colonizing deeper tissues or blood (15, 48). P fimbriae, produced by some APEC strains, are expressed by bacteria that colonize the air sacs, lungs, and internal organs, but are not expressed by those that colonize the trachea (48). Receptor specificity of P fimbriae is conferred by the adhesin PapG, which recognizes different isoreceptors of the globoseries of glycolipids (37). Curli, possessing a major subunit CsgA (42), promote binding to the major histocompatibility complex class I (MHC-I), extracellular matrix and serum proteins (27, 43) and avian intestinal cells (31, 32) and erythrocytes (9), suggesting that they may contribute to APEC infection. Province and Curtiss (49) have described a Tsh in an APEC strain; Tsh belongs to the serine protease autotransporter family of virulence-associated proteins present in numerous pathotypes of *E. coli* and in *Shigella* spp. (26). The *tsh* gene is associated with APEC (16, 38) and is frequently located on ColV-related virulence plasmids. The results of experimental infection studies in chickens with a wild-type strain or an isogenic *tsh* knockout mutant suggest a possible role for Tsh in the early stages of respiratory infection (16). The K1 antigen is frequently associated with APEC, particularly of serogroups O1 and O2. Pourbakhsh et al. (47) showed that APEC K1<sup>+</sup> strains were more resistant to the bactericidal effect of serum than APEC strains expressing other K antigens.

Avian air sacs have no resident cellular defense mechanisms and must rely on an inflammatory influx of heterophils as the first line of cellular defense, followed by

macrophages (20, 21, 60, 61). *In vivo* experiments showed that APEC cells were present in macrophages, but occasionally were also free in the air sac lumen and interstitium of infected chickens. In the airways, bacteria were free within the lumen and mixed with heterophils, erythrocytes, and fibrin (46).

Pourbakhsh et al. (47) showed that *E. coli* strains of high pathogenicity are more capable of invading the host than those with low pathogenicity. In the case of highly pathogenic strains, bacterial cells were often associated *in vivo* with macrophages or were present within macrophages in the air sacs and lungs of infected birds, in contrast to less-pathogenic strains, for which bacteria were rarely observed associated with macrophages. In addition, the pathogenic strains resisted killing by chicken macrophages *in vitro* to a greater extent than the less-pathogenic strains.

Although the potential roles of various APEC virulence factors in pathogenesis of avian colibacillosis have been established, little is known about their interaction with innate immune resistance. This report examines the role of various virulence factors, including curli, type 1 and P fimbriae, Tsh, O antigen polysaccharide, K antigen, and plasmid pAPEC-1 in resistance to avian innate immune defenses (heterophils and macrophages). This was achieved by analyzing the interaction of avian phagocytes with wild-type and mutant APEC strains. Three wild-type APEC strains, each belonging to one of the most predominant serogroups (O1, O2, and O78), and their respective isogenic mutants lacking different virulence factors were examined for their interaction with avian heterophils and macrophages.



## MATERIALS AND METHODS

**Bacterial strains and growth conditions.** The strains used in this study are listed in Table 1. In order to obtain derivatives of APEC strain  $\chi$ 7122 that express different O antigens instead of the native O78 antigen, strain  $\chi$ 7179 a O78<sup>-</sup> histidine-requiring (*hisG::Tn10*) auxotroph of strain  $\chi$ 7122 (Table 1), was used as the recipient for bacteriophage P1 *clm clr100*-mediated transduction. Because *hisG* is closely linked to the *rfb* O-antigen-encoding DNA region, some transduced derivatives would acquire both prototrophy and an O antigen-encoding *rfb* gene cluster. Briefly, P1 phage lysates of strains  $\chi$ 7112 (O1),  $\chi$ 6206 (O26), and  $\chi$ 2963 (O111) were used to transduce strain  $\chi$ 7179 as previously described (8). Transductants were selected for prototrophy by growth on minimal medium containing glucose, and loss of tetracycline resistance mediated by *Tn10* was verified. O antigen-positive clones were confirmed by slide agglutination with O antigen-specific antisera. The O1-, O26-, and O111-expressing derivatives of strain  $\chi$ 7179 were named  $\chi$ 7193,  $\chi$ 7168, and  $\chi$ 7167 respectively.

Strains were grown under conditions (media and temperature) that allowed optimal expression of the appropriate virulence factors, as described in the literature: (i) Strain TK3 and its *papG* mutant were subjected to three passages of 18 h on tryptic soy agar (TSA) at 37°C for optimal production of P fimbriae and minimal production of type 1 fimbriae (18); (ii) Strain MT78 and its mutants were subjected to three overnight consecutive passages in tryptic soy broth (TSB) at 37°C to allow a

high level expression of type 1 fimbriae. (iii) Strains  $\chi$ 7122,  $\chi$ 7273,  $\chi$ 7274, and  $\chi$ 7186 were grown on colonization factor antigen agar at 26°C for 48 h for optimal expression of Tsh and curli (50, 55). (iv) Strains  $\chi$ 7122,  $\chi$ 7193,  $\chi$ 7167,  $\chi$ 7168, and  $\chi$ 7145 were grown in TSB at 37°C for 24 h for optimal expression of O antigens. Strain  $\chi$ 7146 was grown under the same conditions as for the O serotype mutants. Ampicillin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), kanamycin (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), chloramphenicol (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), nalidixic acid (12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), and tetracycline (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) were used as required at the indicated concentrations unless stated otherwise. Serotyping was done by standard slide and tube agglutination techniques (45).

**Opsonization of strains.** Bacteria ( $10^9$  CFU/ml) were opsonized by incubation in 50% serum from nonimmunized specific-pathogen-free chickens for 15 min at 37°C and were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4.

**Resistance to phagocytosis.** Resistance of strains to phagocytosis was examined in primary cells of heterophils, monocyte-derived macrophages, and peritoneal macrophages.

**(i) Isolation of heterophils and monocytes.** Peripheral blood was collected from the wing vein of four 4- to 6-week-old specific-pathogen-free chickens (commercial RossXRoss broiler chickens) using heparin-coated syringes and pooled. Avian heterophils and monocytes were isolated with discontinuous gradients with Percoll (density, 1.13) diluted to an osmolality of 340 mosmol of H<sub>2</sub>O per kg by

adding 9 parts (vol/vol) of 1.5 M NaCl. Further 90, 80, and 70% dilutions of the Percoll solution were made with 0.15 M NaCl. Blood diluted in an equal volume of Hanks balanced salt solution (HBSS) was applied to the top of gradients. The test tubes were centrifuged for 15 min at  $450 \times g$  at room temperature.

Heterophils were removed from a band at the interface between the 80 and 70% layers. The cells were washed twice in HBSS. Precautions were taken with heterophil manipulations as recommended by Andreasen and Latimer (3).

Monocytes were removed from the cloudy region extending from the 80 and 90% layers. The cells were washed twice in HBSS, resuspended in RPMI 1640 medium (GibcoBRL), supplemented with 2 mM L-glutamine, 10% denatured fetal bovine serum, and antibiotics (100 U of Penicillin per ml, 100  $\mu$ g of streptomycin per ml). A volume of 200  $\mu$ l of cell suspension containing approximately  $2 \times 10^5$  cells was added to wells of 96-well tissue culture plates and incubated at 40°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified air atmosphere for 2 h to allow the monocytes to adhere to the plates. The plates were then washed with HBSS to remove all nonadherent cells. Complete medium with antibiotics was then added. To obtain monocyte-derived macrophages, the medium was replaced daily with fresh culture medium for 4 days. The viability of noninfected cells was determined by trypan blue exclusion. Because of problems of multinucleation and an inability to survive for long periods, the monocyte-derived macrophages were not used in all experiments.

**(ii) Isolation of peritoneal macrophages.** A suspension of Sephadex G-50 (3%) in 0.85 % saline was injected into the peritoneal cavity of 4- to 6-week-old chickens (1 ml/100 g of body weight) to elicit macrophages. Two days later, the birds were euthanized, and the peritoneal cavities were aseptically washed with 40 ml of heparinized HBSS to obtain cells in peritoneal exudate. To obtain pure macrophages, cells were applied to a Percoll gradient as described for isolation of monocytes. Harvested cells were washed twice with HBSS and suspended in complete RPMI medium with antibiotics. Cells were added to each well of 96-well plates (Corning well plates) or Lab-Tek Chamber Slides (Nalge Nunc International), and incubated at 40°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified air atmosphere for 2 h to allow macrophages to adhere to the plates. Nonadherent cells were removed by three washings with HBSS.

**(iii) Bacterial infection of cells.** Prior to infection with bacteria, cells were washed and resuspended in medium without antibiotics. Bacterial suspensions in HBSS, opsonized or not, were then added to cell cultures at a multiplicity of infection of 10 bacteria per cell for both macrophages and heterophils. Plates containing macrophages were incubated for 1 h at 40°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified air atmosphere. Plates containing heterophils were centrifuged for 15 min at 200 × g to improve bacterial adherence and then incubated for 45 min at 40°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified air atmosphere.

**(iv) Association of bacteria with cells.** Macrophage suspensions were added to the wells of Lab-Tek slides, and heterophils were added to the wells of 24-well plates

containing Thermanox (Nalge Nunc International, USA) coverslips. Following bacterial infection and incubation as described above, cells were washed twice with HBSS. Lab-Tek slides and coverslips were air dried, and cells were fixed and stained with the Diff-Quick kit (Dade Behring) according to the manufacturer's instructions. One hundred individual cells per sample were randomly selected for counting of associated bacteria using light microscopy.

**(v) Viability of bacteria associated with cells.** Viability of associated bacteria was assessed using the Live/Dead *BacLight* viability Kit (Molecular Probes, Eugene, Org.). Heterophils were washed twice with HBSS to eliminate nonadherent bacteria. The fluorescent dye mixture was added to yield final concentrations of 10  $\mu\text{M}$  SYTO 9 and 60  $\mu\text{M}$  propidium iodide, and plates were incubated for 15 min at room temperature in the dark and then examined under fluorescence using a Leitz Diaplan microscope (Leica Microsystems, Canada Inc). One hundred individual heterophils that had nuclei staining orange-red were examined per sample. Live bacteria could exclude propidium iodide and thus appeared green from staining with SYTO 9, whereas dead bacteria stained orange-red due to the propidium iodide. The number of associated bacteria that stained green or orange-red were counted, and the percentage of live (green) bacteria was determined.

Peritoneal macrophages seeded in eight-well Lab-Tek slides were infected with bacteria and incubated in the same conditions as described before and then stained with the Live/Dead Kit as described for heterophils, with the exception that they were

treated with 0.1 % Triton X-100 for 30 s before staining to permeabilize the cell membrane.

**(vi) Intracellular survival.** Internalized bacteria surviving within macrophages were enumerated by the standard gentamicin protection assay. Peritoneal macrophages were infected with opsonized or nonopsonized bacteria at a ratio of 1:10 and incubated at 40°C in a 5% CO<sub>2</sub>-humidified air atmosphere for 1 h. The cells were washed three times with HBSS and incubated for another 2 h in fresh complete RPMI containing 200 µg gentamicin per ml. At this time ( $T_0$ ) and at different incubation times (3, 6, 12, 24, and 48 h) cells were washed three times with HBSS and lysed with 0.1 % Triton X-100 in PBS for 5 min at room temperature. Bacteria were serially diluted and enumerated by colony count on TSA plates. Experiments were repeated three to five times and, in each experiment, tests were repeated two to four times.

**Statistical analyses.** Data are represented as the mean number of at least three experiments  $\pm$  the standard deviation. The Student's *t* test was performed to compare pairs of group means.

## RESULTS

**Ability of wild-type strains and their isogenic mutants to associate with heterophils and macrophages.** In general, under the conditions of this study (i.e., low multiplicity of infection [10 bacteria per cell]), bacteria associated with phagocyte cells more greatly with time, as measured by Diff-Quick, at least up to 1 h after inoculation (data at 30 min not shown), and following opsonization with normal chicken serum. There was generally less bacterial association with heterophils than with macrophages (Fig. 1).

**(i) Type 1 fimbriae promote association with phagocytes.** Wild-type strain MT78, grown under conditions that allow a high level of expression of type 1 fimbriae, demonstrated a higher association with phagocytes than mutant strains PA68 (*fimH*) (Fig. 1A and 2) and DM34 (*fim*) (Fig. 1A). Compared to wild-type strain MT78, mutants DM34 and PA68 were significantly less associated with heterophils, whereas for association with macrophages the difference was significant for DM34, but not for PA68 (Fig. 1A).

**(ii) K1 capsule, O78 antigen and 0-min region, and PapG are unfavorable for association of strains MT78,  $\chi$ 7122, and TK3, respectively, with phagocytes.** The mutant BEN2694 (K1<sup>-</sup>) showed a slightly greater association with macrophages than wild-type strain MT78, following contact for 60 min, although the difference was not significant (Fig. 1A and 2). Wild-type strain  $\chi$ 7122 associated poorly with

phagocytes, even when opsonized, when grown under the conditions used for this study. Following opsonization, mutant  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>) (Fig 1B and 2), O antigen replacement derivatives of  $\chi$ 7122,  $\chi$ 7193 (O1) and  $\chi$ 7167 (O111), and the 0-min replacement mutant  $\chi$ 7146 (Fig. 1B) all demonstrated a greater association with heterophils and macrophages than the wild-type strain  $\chi$ 7122. In contrast, strain  $\chi$ 7168 (O26) was highly associated with macrophages, but not with heterophils (Fig. 1B). Nonopsonized bacteria of all mutant strains were poorly associated with phagocytes, with the exception of mutant  $\chi$ 7146 (0 min).

The wild-type strain TK3, grown in the conditions that allow high expression of P fimbriae, associated poorly with phagocytes, even when opsonized. The mutant TK37G (*papG*) demonstrated a significantly greater association with macrophages than the wild-type parent strain TK3; however, the difference between the strains was not significant for heterophils (Fig. 1D).

**(iii) The other tested virulence factors did not seem to affect bacterial association with phagocytes.** The mutants  $\chi$ 7273 (*tsh*),  $\chi$ 7274 (pAPEC-1-negative), and  $\chi$ 7186 (*csgA*) associated with heterophils and macrophages to a similar extent as the wild-type parent strain  $\chi$ 7122, grown under the same culture conditions (Fig. 1C).

**Viability of phagocyte-associated bacteria of wild-type strains and their respective mutants.** The viability of bacteria associated with phagocytes was examined by the Live/Dead test. Bacterial association observed in these experiments



(data not shown) was similar to that observed in the Diff-Quick test, although greater association was observed with the latter.

For each of the wild-type pathogenic strains MT78,  $\chi$ 7122, and TK3, >63% of heterophil- and macrophage-associated bacteria remained alive after 1 h of contact, whether bacteria were opsonized (Table 2) or not (Data not shown). On the other hand, for the non-pathogenic strain 862, <34% of heterophil-associated bacteria and 50% of macrophage-associated bacteria remained alive after 1 h of contact (Data not shown).

**(i) Fim and K1, O78 antigen and 0-min region, and PapG protect bacteria against bactericidal effect of heterophils and macrophages at 1 h of contact for strains MT78,  $\chi$ 7122, and TK3, respectively.** For the mutant strains DM34 (*fim*) (Table 2) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>) (Table 2, Fig. 2B), the percentage of phagocyte-associated bacteria remaining alive after 1 h of contact was less than that for the wild-type parent strain MT78 (Table 2 and Fig. 2B). In contrast, in the absence of *fimH*, mutant strain PA68 was as resistant to phagocytes as its wild-type parent strain MT78 (Table 2 and Fig. 2B).

The absence of O78 antigen (Fig. 2B) or its substitution by another O antigen resulted in a higher sensitivity of strains ( $\chi$ 7145,  $\chi$ 7193,  $\chi$ 7167, and  $\chi$ 7168) to the bactericidal effects of heterophils and macrophages, than for the wild-type parent strain  $\chi$ 7122 (Table 2). Also, in the absence of the 0-min region corresponding to

strain  $\chi$ 7122, strain  $\chi$ 7146 was more sensitive to the bactericidal effects of phagocytes. For macrophages, the difference with the wild-type strain was significant for the O111-antigen substituted, O78-negative and 0-min mutants when bacteria were opsonized (Table 2) and for the O111 and O26 antigen-substituted mutants when bacteria were not opsonized (data not shown). For heterophils, the viability of the wild-type strain was significantly higher than viability of all O antigen polysaccharide mutants when bacteria were opsonized (Table2).

A null mutation in the *papG* gene (strain TK37G) resulted in a decrease in the resistance of strain TK3 to the bactericidal effect of heterophils and macrophages. This was more apparent in the case of heterophils, since the difference was significant for the former but not the latter (Table2).

**(ii) Other virulence factors tested did not greatly affect the bacterial sensitivity to phagocytes.** A mutation in the *tsh* gene (strain  $\chi$ 7273) or the absence of pAPEC-1 plasmid (strain  $\chi$ 7274) resulted in a decrease in the resistance of strains to the bactericidal effect of heterophils and macrophages, although the differences versus the wild-type strain were not significant.

**Tested virulence factors do not appear to affect bacterial persistence in macrophages, although nonopsonic phagocytosis is more efficient than opsonic phagocytosis in some cases.** We examined intracellular survival of APEC wild-type strains and mutant derivatives in macrophages. Our results show that despite

differences in association of bacteria of each strain with macrophages as observed above, the number of live intracellular bacteria at  $T_0$  was approximately the same for all tested strains.

There was little apparent difference between wild-type strains and their respective mutant strains with respect to their persistence in macrophages, although nonopsonized mutants DM34 (Fim-) (Data not shown), PA68 (FimH-), and BEN2694 (K1-) were completely eliminated between 24 and 48 h, whereas wild-type strain MT78 persisted more than 48 h in macrophages, whether opsonized or not (Fig. 3B). When opsonized, the O26 antigen-substituted mutant ( $\chi$ 7168) persisted less well than the wild-type strain  $\chi$ 7122 or its other mutants at 24 and 48 h (data not shown).

Interestingly, bacteria of some of the strains persisted less well following nonopsonic phagocytosis than following opsonic phagocytosis. This was observed for mutant strains  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>) and  $\chi$ 7146 (0 min<sup>-</sup>) of  $\chi$ 7122, and PA68 (FimH<sup>-</sup>) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>) of MT78, and APEC strain TK3 and its mutant TK37G (PapG<sup>-</sup>) (Fig. 3). The differences were significant between 0 and 24 h for  $\chi$ 7145 and  $\chi$ 7146 and between 24 and 48 h for PA68, TK3, and TK37G. The other strains tested were generally eliminated to the same extent, whether opsonised or not.

## DISCUSSION

Many virulence factors have been associated with APEC strains, although their role in pathogenesis is not well known. Extrapolation from mammalian results would not be appropriate because of particularities of the avian immune system. In fact, the inflammatory response in avian species more closely resembles the reptilian response than that of mammals (39). This is the first study in which the role of different virulence factors, including O serotype, F1 and P fimbriae, curli, Tsh, and pAPEC-1, in bacterial interaction with heterophil and macrophage phagocytes was investigated by using mutants of three APEC strains belonging to the most predominant serogroups, O1, O2, and O78.

In this study, the three examined APEC strains and their isogenic mutants, grown under conditions favoring expression of the appropriate virulence factors, behaved differently with respect to specific stages of phagocytosis, such as opsonization, attachment, internalization, and bacterial killing.

The ability to express fimbriae allows bacteria to attach to and colonize epithelial surfaces. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that MT78 adheres to tracheal and pharyngeal cells, whereas its mutants DM34 (*fim*) and PA68 (*fimH*), which no longer produce type 1 fimbriae or adhesin FimH, respectively, are unable to adhere to these cells (4, 35). Similarly, our results showed that MT78 was associated highly with phagocytic cells. Even when the bacteria are not opsonized, type 1

fimbriae are known to promote adhesion to phagocytic cells by lectin-carbohydrate interactions (41). Experiments carried out in the absence of complement opsonization allowed us to distinguish between phagocytosis mediated by fimbriae and that mediated by complement. This is an important observation, as opsonization may obscure fimbriae-related events that are important in conditions where normal opsonic activity is impaired (6, 54). In absence of type 1 fimbriae, bacteria of mutants PA68 (*fimH*) and DM34 (*fim*) associated poorly with macrophages and opsonization had little effect on them, possibly due to the presence of K1 capsule. In fact, according to Horwitz and Silverstein (28), nonimmune serum is a poor opsonin for strains carrying the K antigen, because the capsule may prevent association simply due to its hydrophobicity and negative charge. Indeed, the K1-mutant strain was highly associated with phagocytic cells. It is probable that the importance of K1 capsule would have been more apparent in the absence of F1 fimbriae. The use of a double K1<sup>-</sup> and *fim* mutant would help to resolve this question. It would also be interesting to examine the role of the different variants of type 1 present on other APEC serotypes, such as O78, in phagocyte adherence, because such variation in the FimA protein may affect the binding affinity of the type 1 adhesin (33). Based on serological, nucleotide sequence, and amino acid composition differences in the FimA subunit, a number of closely related variants of type 1 fimbriae have been identified in *E. coli* strains. Marc and Dho-Moulin (36) identified four variable regions in the *fimA* sequence of MT78 (O2: K1), including a fragment of gene *fimA*, which is specific for most O2 strains.

Some microorganisms escape the host immune system by remaining inaccessible to it. Bacteria may avoid phagocytic cells by the repulsion effect of P fimbriae via electrostatic properties of their PapG adhesin, as has been demonstrated for human *E. coli* strains (59) or due to a lack of membrane glycolipid receptors for P fimbriae on host cells (57, 58). Some APEC strains also express P fimbrial adhesin, although its implication in the pathogenic process has not yet been elucidated. In this study, the *papG*-mutant strain TK37G was more greatly associated with phagocytes, especially with macrophages, than its wild-type parent. Our results agree with those of Tewari et al. (59) who used a *papG* mutant from a human serotype O6: K5: H strain.

This low bacterial association with phagocytes could result from a combination of several virulence factors that prevent association. Among these factors, the K1 capsule, as demonstrated with strain MT78, reduces association of bacteria with phagocytes. Hence, the role of P fimbriae in O1:K1 strain TK3 would probably be more apparent in the absence of K1 capsule.

APEC strain  $\chi$ 7122, grown in two different conditions to promote the expression of different surface components, associated poorly with phagocytic cells, even when opsonized. Similarly, Rosenberd-Arska et al. (52) had noted that a human O78:K80 strain was poorly associated with phagocytes when treated with nonimmune serum and required specific antibodies for effective opsonization. In the present study, we showed that deletion of the *rfb* locus encoding O78 antigen or replacement

of the O78 antigen in strain  $\chi$ 7122 by antigens of other O serotypes (O1, O26, and O111) allowed bacteria to associate more extensively with phagocytic cells, particularly when bacteria were opsonized. Similarly, Burns and Hull (10) showed that absence of the O75 antigen from a uropathogenic O75:K5 *E. coli* strain resulted in greater ingestion by polymorphonuclear PMNs than the wild-type strain. Hence, accessibility of opsonin to the bacterial surface and effectiveness of complement fixation appear to depend on the presence and composition of lipopolysaccharide (LPS) sugar chains. For instance, the O antigen polysaccharides tested (O1, O26, O111, and O78) differ in their sugar composition (24, 25, 29, 34).

Tsh, pAPEC-1, and curli mutant derivatives of APEC strain  $\chi$ 7122 (Table 1) were also only weakly associated with phagocytes, denoting the low importance of Tsh and curli in bacterial association with phagocytic cells for  $\chi$ 7122. However, it has been shown that curli-expressing strains bound much more human (43) and murine (30) MHC-I and  $\beta_2m$  than curli-deficient mutant strains. This difference in results may be explained by the presence on APEC strain  $\chi$ 7122 of certain surface structures, such as K80 capsule (8), that may prevent interaction of curli with MHC-I.

In *in vivo* studies, apparently viable bacteria of highly pathogenic isolates were often observed associated with or located within macrophages in the air sacs and lungs of inoculated birds (46). In the present study, the role of various virulence factors in the viability of bacteria associated with heterophils and macrophages was assessed *in vitro* by fluorescent dye exclusion at 1 h postinfection. This test is of

double interest, because it determines bacterial association with phagocytes and viability of both extracellular and intracellular bacteria associated with the phagocytes. Bacterial association data, as determined with this test, confirmed those observed with the Diff-Quick test, although greater bacterial association was observed with the latter, probably because cells were fixed in the latter, but not in the former test.

The different infection patterns suggest that the various virulence attributes of the three isolates probably mediated different bacterial mechanisms of resistance to the innate immune system. Our results demonstrate that several of the tested virulence factors—namely type 1 fimbriae and K1 capsule in strain MT78, O antigen and 0-min region in strain  $\chi$ 7122, and PapG in strain TK3—seemed to protect bacteria against killing by phagocytic cells, especially heterophils, following 1 h of interaction (Table 2). The role of type 1 fimbriae in pathogenicity is controversial. Our results agree with those of *in vivo* tests that revealed that mutant DM34 (*fim*) was less able to survive in the lungs of chickens than the parent strain MT78 (35). Hence, it appears that the type 1 fimbriae, when expressed, would promote bacterial phagocytosis, but would nevertheless protect the phagocyte-associated bacteria from subsequent killing, although the mechanism for this is not known. The FimH adhesin does not appear to be involved in this protection, because the *fimH*-mutant strain was as resistant to killing as the wild-type strain. For O78 antigen, K1 capsule, and the 0-min region of the chromosome, our phagocyte viability results agree with the *in vivo* chicken inoculation results, in which the appropriate mutant strains were less invasive than



their respective wild-type strains (Mellata et al. submitted). These virulence factors and PapG adhesin may down regulate heterophil and macrophage antimicrobial functions. In fact, Tewari et al. (59) demonstrated that a *papG*-mutant *E. coli* strain elicited a considerably higher oxidative burst response from neutrophils than that evoked by its wild-type parent. Examination of host response, such as the oxidative, nitric oxide, and cytokine response could help to elucidate the mechanisms used by APEC bacteria to resist chicken phagocytes.

Several bacterial species have developed survival mechanisms that prevent killing of bacteria after they have been phagocytosed by macrophages (53). In the present study, intracellular persistence of bacteria was assessed in macrophages rather than in heterophils, because invasive bacteria generally target host cells that have a longer life span.

The virulence factors tested in this study play a limited role in persistence of bacteria in macrophages, because the mutants behaved similarly to their parent wild-type strains. However, since K1 and O78 antigen mutant strains were sensitive to the first steps of the innate immune response (i.e., the bactericidal effects of serum and heterophils (Mellata et al. submitted, this study), they would probably have been eliminated before they reached the macrophages.

Depending in their ability to persist in macrophages in the presence or absence of opsonization, two groups of bacterial strains were distinguished: those for

which persistence was affected by opsonization, and those for which it was not. These results suggest that, similarly to mammalian phagocyte cells, chicken macrophages possess appropriate machinery to mediate different ways of phagocytosis. Our unexpected finding was the persistence of some strains to a greater extent when opsonized than when nonopsonized. Although nonopsonic phagocytosis is considered as an important arm of host defense, it is generally less efficient than opsonic phagocytosis (40). Our results suggest that nonopsonic phagocytosis, characterized by a primitive holdover ingestion mechanism, may, in certain circumstances, be more efficient than opsonic phagocytosis in chickens. The finding that the nonopsonic phagocytosis was more efficient in the absence of O78 antigen or 0-min region for  $\chi$ 7122 and FimH and K1 capsule for MT78 or for APEC strain TK3 (Fig. 3) indicates that the nature of the surface molecular structure of the bacteria may orient the way that bacteria will be phagocytosed. Further investigation of the biochemical mechanisms of the response of chicken macrophages under both conditions is essential for a better understanding of the pathogenesis of the infection process and may also provide a basis for improved methods for treatment and prevention of APEC infection.

Taken together, our results show that different virulence factors associated with APEC strains determine the behavior of these strains in the presence of phagocytes. Type 1 fimbriae in MT78 promote bacterial association with phagocytes, whereas K1 capsule in MT78, O78 antigen and 0-min region in  $\chi$ 7122, and P fimbriae in TK3 allow bacteria to avoid phagocytes, indicating different mechanisms

used by APEC strains in their interaction with phagocyte cells. APEC strains are able to resist the bactericidal effects of phagocytes to a much greater extent than a nonpathogenic strain. We have demonstrated a role for some virulence factors (Fim and K1 capsule in MT78, O78 serotype and 0-min region in  $\chi$ 7122, and P fimbriae in TK3) in resistance to this bactericidal effect of phagocytes, and this is more apparent in the case of heterophils. These results are particularly interesting, since heterophils form the first line of avian cellular defense against invading pathogens in the lungs and air sacs, where resident macrophages are lacking (20, 21, 60, 61). Heterophil activity would restrict bacterial multiplication to a level permitting more efficient elimination of bacteria by the subsequent host defenses. *E. coli* strains possessing Fim, K1 capsule, O78 serotype, the 0-min region, or P fimbriae would more successfully combat this heterophil activity and subsequently invade the host. The virulence factors tested in this study seem to play a limited role in persistence of APEC strains within macrophages. We are currently looking for other genes potentially involved in this step of pathogenesis.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Guy Beauchamp for assistance in statistical analyses. This work was supported by Formation des Chercheurs et à l'Aide de la Recherche du Québec (FCAR) grant 0214, Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 2294 to J.M.F., and U. S. Department of Agriculture National Research Initiative Competitive Grant Program grants 94-37204-1091 to R.C. and 97-35204-4512 and 00-35204-9224 to R.C. and C.M.D.

**BIBLIOGRAPHY**

1. **Achtman, M., A. Mercer, B. Kusecek, A. Pohl, M. Heuzenroeder, W. Aaronson, A. Sutton, and R. P. Silver.** 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect Immun* **39**:315-35.
2. **Ackermann, M. R., and N. F. Cheville.** 1991. Ultrastructural studies of the lung of turkeys (*Meleagris gallopavo*) inoculated intratracheally with *Escherichia coli*. *Vet PATHOL* **28**:183-191.
3. **Andreasen, C. B., and K. S. Latimer.** 1989. Separation of avian heterophils from blood using Ficoll-Hypaque discontinuous gradients. *Avian Dis* **33**:163-7.
4. **Arné, P., D. Marc, A. Brée, C. Schouler, and M. Dho-Moulin.** 2000. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a *fimH* deletion. *Avian Dis* **44**:343-55.
5. **Ashkenazi, S., and T. G. Cleary.** 1989. Rapid method to detect shiga toxin and shiga-like toxin I based on binding to globotriosyl ceramide (Gb3), their natural receptor. *J Clin Microbiol* **27**:1145-50.

6. **Bjorksten, B., and T. Wadstrom.** 1982. Interaction of *Escherichia coli* with different fimbriae and polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **38**:298-305.
7. **Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, W. H. Jansen, V. Garcia, M. L. Vazquez, and J. Blanco.** 1998. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (northwest Spain). *Vet Microbiol* **61**:229-35.
8. **Brown, P. K., and R. Curtiss III.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11149-54.
9. **Brown, P. K., C. M. Dozois, C. A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge, and R. Curtiss III.** 2001. *MlrA*, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol* **41**:349-63.
10. **Burns, S. M., and S. I. Hull.** 1999. Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O(-) and K(-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 strain. *Infect Immun* **67**:3757-62.
11. **Cheville, N. F., and L. H. Arp.** 1978. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **173**:584-58.

12. **Cloud, S. S., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, R. A. Wilson, and E. M. Odor.** 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. *Avian Dis* **29**:1084-93.
13. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**:299-316.
14. **Dho-Moulin, M., J. F. Van den Bosch, J. P. Girardeau, A. Brée, T. Barat, and J. P. Lafont.** 1990. Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect Immun* **58**:740-5.
15. **Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* **38**:231-9.
16. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss III.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**:4145-54.

17. **Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bosse.** 1992. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* **60**:2648-56.
18. **Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh, and J. M. Fairbrother.** 1995. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol* **45**:297-309.
19. **Fairbrother, J. M., A. Broes, M. Jacques, and S. Lariviere.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am J Vet Res* **50**:1029-36.
20. **Ficken, M. D., and H. J. Barnes.** 1989. Acute airsacculitis in turkeys inoculated with *Pasteurella multocida*. *Vet Pathol* **26**:231-7.
21. **Ficken, M. D., J. F. Edwards, and J. C. Lay.** 1986. Induction, collection, and partial characterization of induced respiratory macrophages of the turkey. *Avian Dis* **30**:766-71.
22. **Goldman, R. C., D. White, F. Ørskov, I. Ørskov, P. D. Rick, M. S. Lewis, A. K. Bhattacharjee, and L. Leive.** 1982. A surface polysaccharide of



*Escherichia coli* O111 contains O-antigen and inhibits agglutination of cells by O-antiserum. *J Bacteriol* **151**:1210-21.

23. **Gross, W. B.** 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, pp.237-259. In Gyles. C.L. (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and Man. CAB International, Wallingford, UK.
24. **Gupta, D. S., A. S. Shashkov, B. Jann, and K. Jann.** 1992. Structures of the O1B and O1C lipopolysaccharide antigens of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:7963-70.
25. **Gupta, R. K., W. Egan, D. A. Bryla, J. B. Robbins, and S. C. Szu.** 1995. Comparative immunogenicity of conjugates composed of *Escherichia coli* O111 O-specific polysaccharide, prepared by treatment with acetic acid or hydrazine, bound to tetanus toxoid by two synthetic schemes. *Infect Immun* **63**:2805-10.
26. **Henderson, I. R., and J. P. Nataro.** 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**:1231-43.
27. **Herwald, H., M. Morgelin, A. Olsèn, M. Rhen, B. Dahlback, W. Muller-Esterl, and L. Bjorck.** 1998. Activation of the contact-phase system on

- bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med* **4**:298-302.
28. **Horwitz, M. A., and S. C. Silverstein.** 1980. Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J Clin Invest* **65**:82-94.
  29. **Jansson, P. E., B. Lindberg, G. Widmalm, and K. Leontein.** 1987. Structural studies of the *Escherichia coli* O78 O-antigen polysaccharide. *Carbohydr Res* **165**:87-92.
  30. **Johansson, C., T. Nilsson, A. Olsèn, and M. J. Wick.** 2001. The influence of curli, a MHC-I-binding bacterial surface structure, on macrophage-T cell interactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* **30**:21-9.
  31. **La Ragione, R. M., R. J. Collighan, and M. J. Woodward.** 1999. Non-curliation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection. *FEMS Microbiol Lett* **175**:247-53.
  32. **La Ragione, R. M., W. A. Cooley, and M. J. Woodward.** 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli*

- O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol* **49**:327-38.
33. **Madison, B., I. Ofek, S. Clegg, and S. N. Abraham.** 1994. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. *Infect Immun* **62**:843-8.
  34. **Manca, M. C., A. Weintraub, and G. Widmalm.** 1996. Structural studies of the *Escherichia coli* O26 O-antigen polysaccharide. *Carbohydr Res* **281**:155-60.
  35. **Marc, D., P. Arné, A. Brée, and M. Dho-Moulin.** 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a *fim*- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**:473-85.
  36. **Marc, D., and M. Dho-Moulin.** 1996. Analysis of the *fim* cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*. *J Med Microbiol* **44**:444-52.
  37. **Marklund, B. I., J. M. Tennent, E. Garcia, A. Hamers, M. Baga, F. Lindberg, W. Gaastra, and S. Normark.** 1992. Horizontal gene transfer of the *Escherichia coli* *pap* and *prs* pili operons as a mechanism for the development of tissue-specific adhesive properties. *Mol Microbiol* **6**:2225-42.

38. **Maurer, J. J., T. P. Brown, W. L. Steffens, and S. G. Thayer.** 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **42**:106-18.
39. **Montali, R. J.** 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol* **99**:1-26.
40. **Ofek, I., J. Goldhar, Y. Keisari, and N. Sharon.** 1995. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **49**:239-76.
41. **Ofek, I., and N. Sharon.** 1988. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* **56**:539-47.
42. **Olsèn, A., A. Arnqvist, M. Hammar, and S. Normark.** 1993. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect Agents Dis* **2**:272-4.
43. **Olsèn, A., M. J. Wick, M. Morgelin, and L. Björck.** 1998. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun* **66**:944-9.

44. **Orndorff, P. E.** 1994. *Escherichia coli* type 1 pili, p. 91-111. In V. L. Miller, J. B. Kaper, D. A. Portnoy, and R. R. Isberg (ed.), Molecular genetics of bacterial pathogenesis. ASM, Washington, DC.
45. **Ørskov, F., and I. Ørskov.** 1984. Serotyping of *E. coli*, p. 43-112. In N. J. R. Bergann T. (ed.), Methods In Microbiology, New York.
46. **Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, C. M. Dozois, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1997. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. Avian Dis **41**:221-33.
47. **Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. Vet Microbiol **58**:195-213.
48. **Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. Microb Pathog **22**:331-41.
49. **Provence, D. L., and R. Curtiss III.** 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Infect Immun **62**:1369-80.

50. **Provence, D. L., and R. Curtiss III.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect Immun* **60**:4460-7.
51. **Rosenberger, J. K., P. A. Fries, and S. S. Cloud.** 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. III. Immunization. *Avian Dis* **29**:1108-17.
52. **Rozenberg-Arska, M., M. E. Salters, J. A. van Strijp, J. J. Geuze, and J. Verhoef.** 1985. Electron microscopic study of phagocytosis of *Escherichia coli* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **50**:852-9.
53. **Russell, D. G.** 2000. What is the very model of a modern macrophages pathogen?, p. 107-117. *In* K. Brogden, J. A. Roth, T. B. Stanton, C. Bolin, F. Minion, and M. J. Wannemuehler (ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*, Third edition ed. ASM Press, Washington.
54. **Silverblatt, F. J., J. S. Dreyer, and S. Schauer.** 1979. Effect of pili on susceptibility of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun* **24**:218-23.
55. **Stathopoulos, C., D. L. Provence, and R. Curtiss III.** 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh,

a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect Immun* **67**:772-81.

56. **Stearns, R. C., G. M. Barnas, M. Walski, and J. D. Brain.** 1987. Deposition and phagocytosis of inhaled particles in the gas exchange region of the duck, *Anas platyrhynchos*. *Respir Physiol* **67**:23-36.
57. **Svanborg Eden, C., L. M. Bjursten, R. Hull, S. Hull, K. E. Magnusson, Z. Moldovano, and H. Leffler.** 1984. Influence of adhesins on the interaction of *Escherichia coli* with human phagocytes. *Infect Immun* **44**:672-80.
58. **Svanborg-Eden, C., L. Hagberg, R. Hull, S. Hull, K. E. Magnusson, and L. Ohman.** 1987. Bacterial virulence versus host resistance in the urinary tracts of mice. *Infect Immun* **55**:1224-32.
59. **Tewari, R., T. Ikeda, R. Malaviya, J. I. MacGregor, J. R. Little, S. J. Hultgren, and S. N. Abraham.** 1994. The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun* **62**:5296-304.
60. **Toth, T. E., P. Siegel, and H. Veit.** 1987. Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: elicitation versus activation. *Avian Dis* **31**:861-7.

61. **Toth, T. E., and P. B. Siegel.** 1986. Cellular defense of the avian respiratory tract: paucity of free-residing macrophages in the normal chicken. *Avian Dis* **30:67-75.**



**Table 1. Bacterial strains used in this study.**

<b>Wild-type strain</b>	<b>Mutant strains</b>	<b>Mutation</b>	<b>Genotype and characteristics<sup>a</sup></b>	<b>References</b>
TK3			APEC O1: K1: H7	(18)
	TK37G (fimbriae)	PapG-	<i>papG</i> mutant of strain TK3 produced by allelic exchange using pKNG101 based suicide vector, Km <sup>R</sup>	C. Martin, personal communication
MT78			APEC O2: K1: H+, Nal <sup>R</sup>	(14)
	PA68 (fimbriae)	FimH-	MT78 ( $\Delta$ <i>fimH</i> )	(4)
	DM34 (fimbriae)	Fim-	MT78 ( $\Delta$ <i>fim</i> )	(35)
	BEN2694 (capsule)	K1-	MT78 spontaneous K1-negative mutant, Nal <sup>R</sup>	This work
$\chi$ 7122			APEC O78:K80:H9, <i>gyrA</i> Nal <sup>R</sup>	(8)
	$\chi$ 7179 (LPS)	O78-	O78-negative derivative of $\chi$ 7122 <i>hisG::Tn10 rfb</i>	(8)
$\chi$ 2963			Strain CL99, O111 : « B4 »	(22)
	$\chi$ 7167 (LPS)	O111	$\chi$ 7179 <i>rfb+</i> (O111) prototroph by P1 $\chi$ 2963 lysate	This work
$\chi$ 6206			Strain H30, O26:H11, SLT-1+	(5)
	$\chi$ 7168 (LPS)	O26	$\chi$ 7179 <i>rfb+</i> (O26), prototroph by P1 $\chi$ 6206 lysate	This work
$\chi$ 7112			Strain A137, O1:K1:H7 ColV+	(1)
	$\chi$ 7193 (LPS)	O1	$\chi$ 7179 <i>rfb+</i> (O1), prototroph by P1 $\chi$ 7112 lysate	This work

**Table 1. Bacterial strains used in this study (cont.)**

$\chi$ 7112			Strain A137, O1:K1:H7 ColV+ isolate from human septicemia	(1)
	$\chi$ 7193 (LPS)	O1	$\chi$ 7179 <i>rfb</i> + (O1), prototroph by P1 $\chi$ 7112 lysate	This work
$\chi$ 289			W1485 $\lambda^-$ <i>glnV44</i> F	(8)
	$\chi$ 7145 (LPS)	O78-	$\chi$ 7122 ( $\chi$ 289: <i>hisG-zee</i> ), <i>rfb</i> deleted by replacement with <i>E. coli</i> K-12 region at 45 min	(8)
	$\chi$ 7146 (other)	0 min-	$\chi$ 7122 ( $\chi$ 289: <i>thr-car</i> ): 0 min region replaced with <i>E. coli</i> K-12 region	(8)
	$\chi$ 7273 (other)	Tsh-	$\chi$ 7122 <i>tsh::tetAR(B)</i> , Nal <sup>R</sup> Tc <sup>R</sup>	(16)
	$\chi$ 7274 (other)	pAPEC-1-	$\chi$ 7273 cured of virulence plasmid pAPEC-1, Nal <sup>R</sup>	(16)
	$\chi$ 7186 (other)	Curli-	$\chi$ 7122 curli-negative mutant; <i>csgA</i> : : <i>cat</i> , Nal <sup>R</sup> , Cm <sup>R</sup>	(9)
862			Non-pathogenic <i>E. coli</i> O115, K-, F165-	(19)

<sup>a</sup> Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol ; Km, kanamycin ; Nal, nalidixic acid ; Tc, tetracycline

**Table 2. Resistance of opsonized APEC to killing by phagocytes at 1 h of contact determined by Live/Dead test.**

Strains <sup>a</sup>	% of live opsonized bacteria associated with phagocytes <sup>b</sup>	
	Heterophils	Macrophages
MT78	75.31 ± 5.21	63.37 ± 11.30
PA68	69.85 ± 11.67	63.06 ± 24.04
DM34	59.23 ± 20.81*	55.14 ± 17.16
BEN2694	56.42 ± 21.90 *	55.24 ± 9.87
$\chi$ 7122	84.64 ± 11.93	77.60 ± 21.03
$\chi$ 7193	51.33 ± 17.73 *	62.05 ± 14.90
$\chi$ 7167	54.70 ± 18.32 *	48.75 ± 16.71*
$\chi$ 7168	52.94 ± 21.26 *	55.01 ± 21.82
$\chi$ 7145	56.96 ± 19.18 *	54.14 ± 13.50 *
$\chi$ 7146	61.74 ± 17.21*	46.47 ± 12.20 *
$\chi$ 7122	76.84 ± 4.46 <sup>c</sup>	86.11 ± 9.06
$\chi$ 7273	64.06 ± 24.08	74.04 ± 22.74
$\chi$ 7274	ND <sup>d</sup>	67.20 ± 30.46
$\chi$ 7186	ND	88.64 ± 18.61
TK3	92.81 ± 9.03	74.98 ± 10.65
TK37G	61.26 ± 6.73 *	67.43 ± 17.90

<sup>a</sup> The strains listed represent the following: APEC strain MT78 and its mutants PA68 (*fimH*), DM34 (*fim*) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>); APEC strain  $\chi$ 7122 and its mutants  $\chi$ 7193 (O1),  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26),  $\chi$ 7145 (O78-), and  $\chi$ 7146 (0min); APEC strain

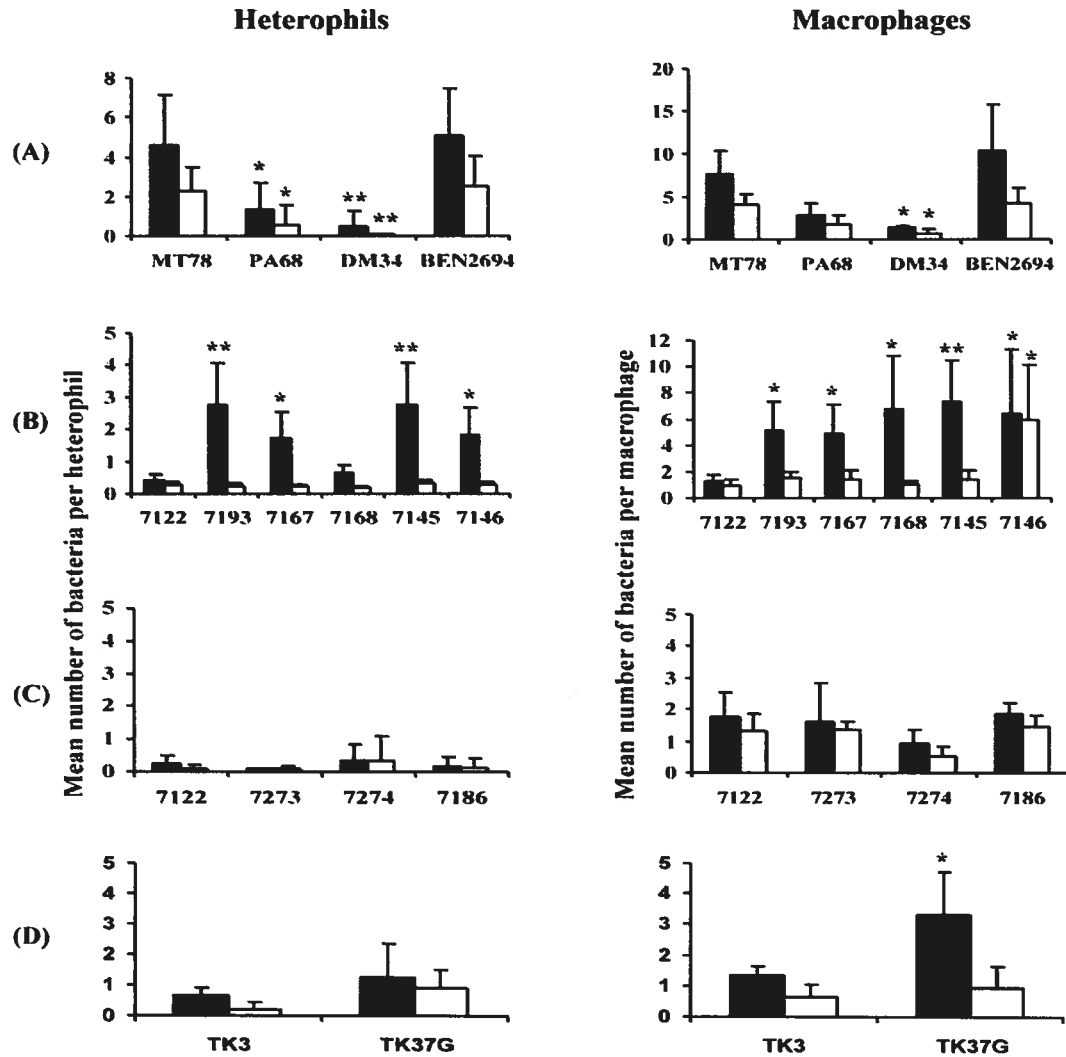
$\chi$ 7122 and its mutants  $\chi$ 7273 (*tsh*),  $\chi$ 7274 (pAPEC-1-negative) and  $\chi$ 7186 (*csgA*); and APEC strain TK3 and its mutant TK37G (*papG*).

\* Significant difference versus wild-type strain ( $P < 0.05$ ).

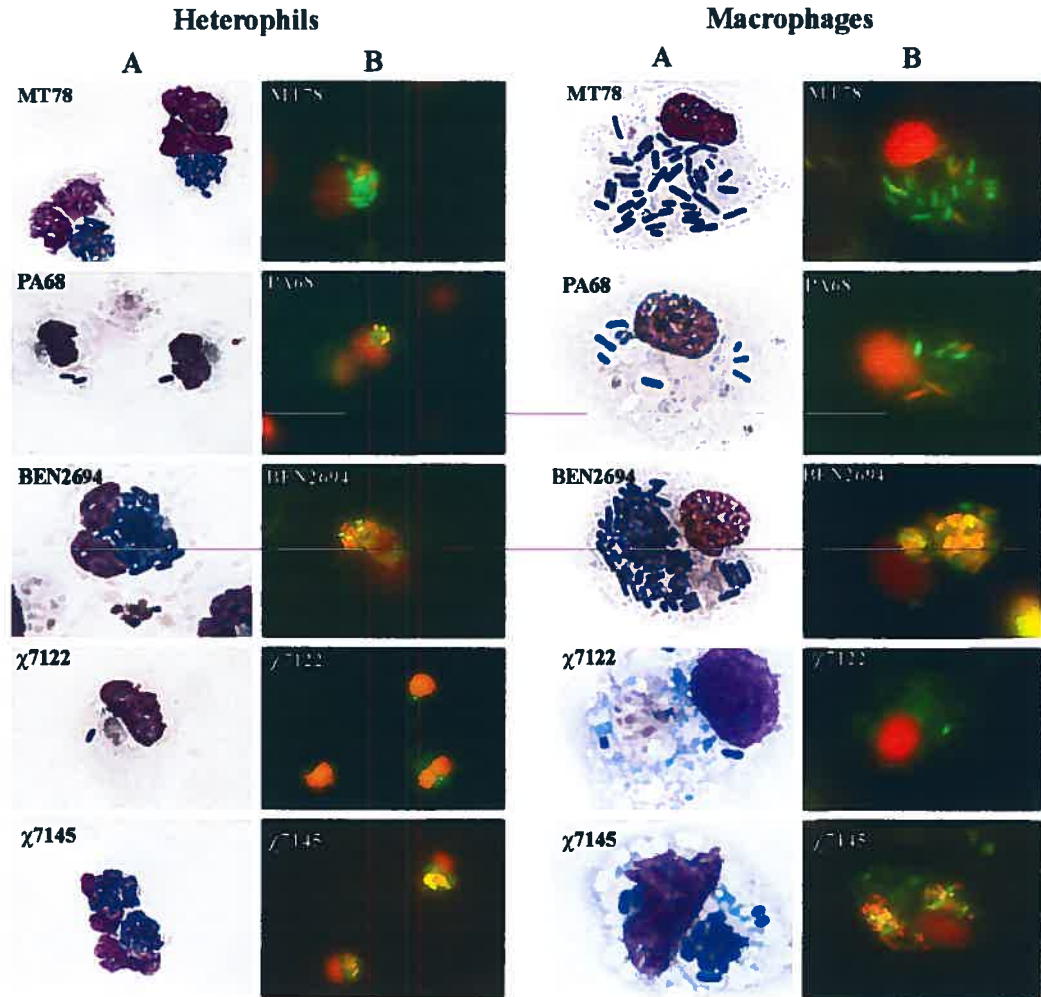
<sup>b</sup>Percentage of associated bacteria able to exclude propidium iodide. Results are the means  $\pm$  standard derivation of a least four experiments.

<sup>c</sup>Among the n times tested, this strain has associated only two times with phagocytes, but not enough for statistical analysis.

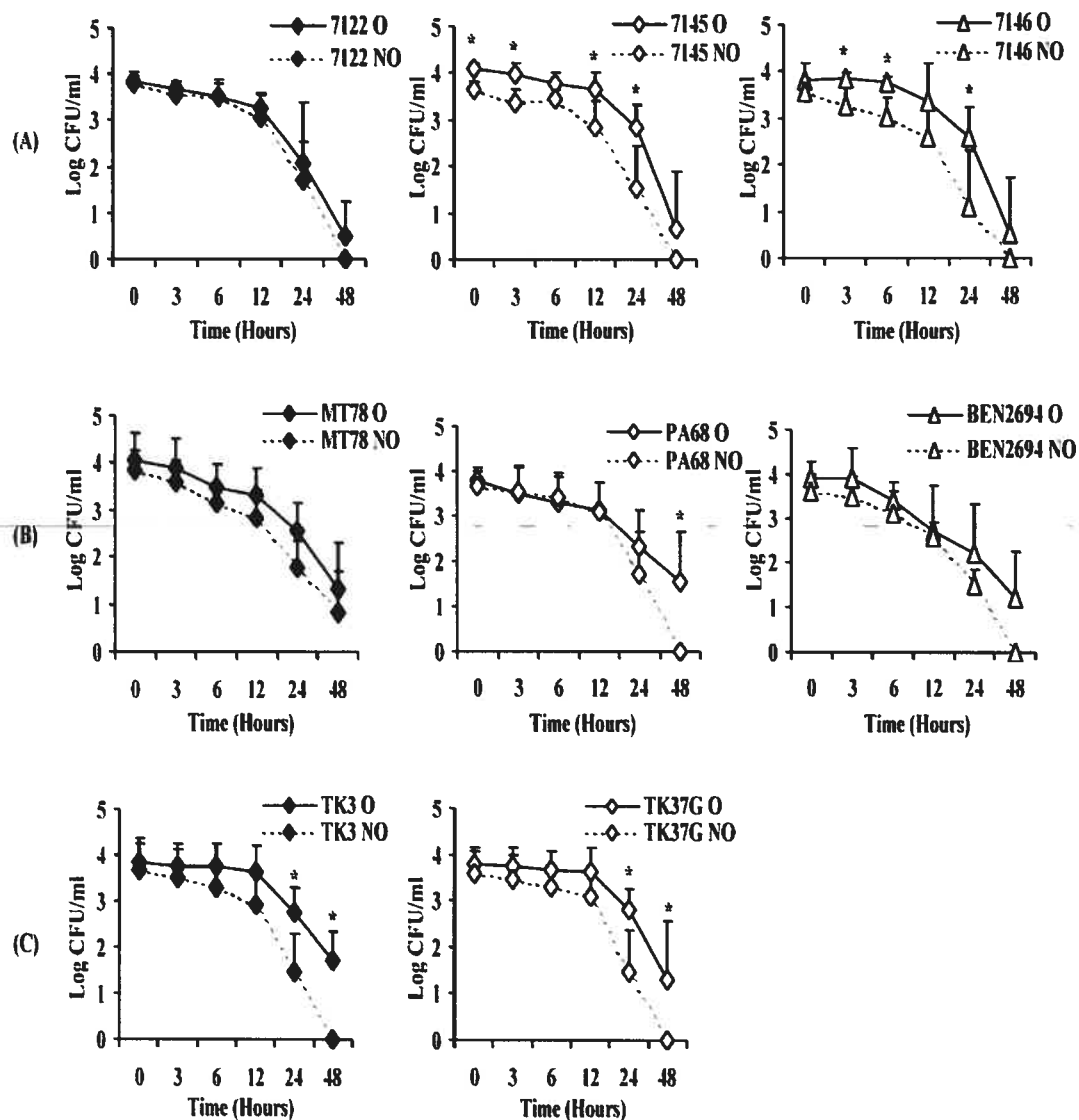
<sup>d</sup>ND, nondetectable



**FIG. 1.** Association of opsonized ( ■ ) and non-opsonized ( □ ) APEC with heterophils and macrophages. **(A)** APEC strain MT78 and its mutants PA68 (*fimH*), DM34 (*fim*) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>); **(B)** APEC strain  $\chi$ 7122 and its mutants  $\chi$ 7193 (O1),  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26),  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>) and  $\chi$ 7146 (0 min). **(C)** APEC strain  $\chi$ 7122 and its mutants  $\chi$ 7273 (*tsh*),  $\chi$ 7274 (pAPEC-1-negative) and  $\chi$ 7186 (*csgA*); **(D)** APEC strain TK3 and its mutant TK37G (*papG*). Each group of strains was grown in conditions described in Materials and Methods. The results represent the means  $\pm$  standard deviation of at least three experiments. Asterisks show significant difference versus the wild-type strain (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ).



**FIG. 2.** Representative photos demonstrating the association and viability of APEC strains and their respective mutants. Shown are APEC strain MT78 and its mutants, PA68 (*fimH*) and BEN2694 ( $K1^-$ ), as well as APEC strain  $\chi7122$  and its mutant,  $\chi7145$  ( $O78^-$ ). (A) Diff-Quick stain of bacteria associated with heterophils and macrophages. (B) Fluorescence stain of bacteria associated with heterophils and macrophages using SYTO 9 and propidium iodide (Live/Dead test). Green indicates live bacteria, and orange-red indicates dead bacteria.



**FIG. 3.** Persistence of opsonized (O) and nonopsonized (NO) APEC in macrophages (gentamicin test). The values are shown as log CFU per milliliter, and the results are means of at least three experiments. (A) APEC strain  $\chi$ 7122 and its mutants,  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>) and  $\chi$ 7146 (0 min). (B) APEC strain MT78 and its mutants, PA68 (*fimH*) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>). (C) APEC strain TK3 and its mutant, TK37G (PapG<sup>-</sup>). Asterisks indicate significant difference ( $P < 0.05$ ) between opsonized and nonopsonized bacteria.

**Contribution des auteurs à la réalisation de l'article 2.**

**Melha Mellata :** a conçu et réalisé toutes les expériences décrites dans l'article 2 et a rédigé le manuscrit.

**Maryvonne Dho-Moulin :** a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

**Charles Dozois :** a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

**Roy Curtiss III :** a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

**Brigitte Lehoux :** a contribué par son aide technique dans la récolte du sang et des macrophages des poulets.

**John M. Fairbrother:** a supervisé les travaux de M. Mellata et l'a orientée dans l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections apportées au manuscrit.



**ARTICLE 3****Non-specific macrophage response to avian pathogenic *E. coli* infection *in vitro* and the role of bacterial virulence factors**

Melha Mellata and John M. Fairbrother

Manuscrit soumis "Infection and immunity"

**Non-specific macrophage response to avian pathogenic *E. coli* infection *in vitro* and the role of bacterial virulence factors**

Melha Mellata and John M. Fairbrother\*

Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada

\*Corresponding author. Mailing address: Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada. Phone : (1) 450 773 8521 ext. 8234. Fax (1) 450 778 8108. E-mail: [john.morris.fairbrother@UMontreal.CA](mailto:john.morris.fairbrother@UMontreal.CA).

## SUMMARY

A better understanding of the mechanisms of pathogenesis and the immune response to avian pathogenic *E. coli* (APEC) infection could lead to a more efficacious approach for the treatment and prevention of colibacillosis in chickens.

In our previous studies, we demonstrated that O78 antigen, K1 capsule and 0-min region of the chromosome were implicated in virulence and serum resistance of APEC strains and that these virulence factors, as well as the type 1 and P fimbriae, protected the APEC strains against the bactericidal effect of chicken phagocytes. Herein, using three APEC strains representing the most important serotypes worldwide (O1, O2, and O78) and their isogenic mutants for different virulence factors (LPS, K1 capsule, and type 1 and P fimbriae), we have examined the host response to APEC infection by determining *in vitro* the production of nitric oxide (NO) and oxidative burst in macrophages and in fresh blood respectively, and the induction of inflammatory cytokines in macrophages, as measured by RT-PCR. Our results showed that the production of NO, the induction of cytokines, and the production of oxidative burst depended on the infecting strain and the presence or absence of opsonin. In fact, non-opsonized bacteria generally activated blood cells and macrophages to a greater extent than opsonized bacteria. A high level of NO was produced by macrophages infected with a non-pathogenic O2:K- strain or a K1 mutant of an O2:K1 strain. On the other hand, smooth O1-, O26-, and O111-substituted mutants induced a lower level of NO than the rough mutant (O78-) of APEC strain. The oxidative burst was higher in macrophages infected with O78 and type 1 fimbriae mutants than in macrophages infected with their respective wild type

strains. In blood cells, the oxidative burst was higher with rough (O78-) and PapG mutants of APEC strains. The induction of IL-1 $\beta$ , IL-1r, iNOS, and MIP-1 $\beta$  cytokines depended on the strain and its opsonization state. The APEC strains activated the expression of these cytokines in chicken phagocytes to a lesser extent than the non-pathogenic strain. The presence and the nature of LPS affected induction of IL-1 $\beta$ , IL-6, iNOS, and IL-1 and Fim and PapG seemed to induce MIP-1 $\beta$ . Hence, our results suggest that the non-specific host immune response is important in the initial steps of APEC infection and that certain bacterial virulence factors modulate this response.

## INTRODUCTION

Colibacillosis is one of the most important causes of mortality and carcass condemnation in poultry. The etiologic agent of this infection is avian pathogenic *E. coli* (APEC) which infects chickens via the respiratory tract. APEC are also part of the category of extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), belonging to a limited number of O serogroups, the most widespread being O1, O2, and O78. Virulence factors associated with APEC include type 1 and P fimbriae, curli, K1 capsule, O antigen, and temperature sensitive hemagglutinin (Tsh) (9, 15).

In our previous studies, by testing mutants for different virulence factors, we determined the roles of some virulence factors in pathogenicity *in vivo* and in resistance to the innate immune system, especially to complement and to phagocytes (heterophils and macrophages) *in vitro* (28, 29). We demonstrated that O78 antigen, K1 capsule and the 0-min region of the chromosome were implicated in virulence and serum resistance of APEC strains and that these virulence factors, as well as the type 1 and P fimbriae, protected APEC strains against the bactericidal effect of chicken phagocytes.

Bacterial infections are generally characterized by a strong inflammatory reaction. The mediators of these infections are often bacteria-derived cell wall molecules, which typically stimulate phagocytes, especially macrophages, to release cytokines and a wide variety of products including reactive oxygen intermediates and

nitric oxide, which are toxic for pathogens (38). Modulation of the immune response by virulent microorganisms that have developed a wide variety of devices for countering or avoiding the anti-microbial action of phagocytes determine the pathophysiology of the infection. These pathogens use a variety of different molecular strategies to subvert host cell mechanism, enabling them to invade susceptible host cells (38).

Although the mammalian innate immune response against pathogenic *E. coli* has been largely elucidated, inflammatory mediators elaborated in the initial stages of inflammation in birds infected with APEC strains have not yet been characterized. In order to determine the host response to APEC strains and the role of different virulence factors in the innate immune response to infection, we have measured the NO, oxidative, and cytokine response of phagocytes to APEC strains or to their isogenic mutants for different virulence factors (F and P fimbriae, O antigen, K1 capsule), in the presence or absence of opsonization in vitro, by using blood cells and primary peritoneal macrophages.

## MATERIAL AND METHODS

**Strains, growth conditions and opsonization.** The strains used in this study are listed in Table 1. They were grown overnight in tryptic soy broth (TSB) at 37°C. Ampicillin (100  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), kanamycin (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), chloramphenicol (25  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), nalidixic acid (12.5  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ), and tetracycline (10  $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) were used as required at the indicated concentrations unless stated otherwise.

Bacteria were opsonized by incubation in 50% serum from nonimmunized specific-pathogen-free chickens for 15 min at 37°C and were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) at pH 7.4.

**Culture of peritoneal macrophage cells and infection.** The peritoneal macrophages were elicited by Sephadex G-50 (3%), adjusted to  $3 \times 10^6$  cells/ml, infected with nonopsonized or opsonized bacteria at a multiplicity of infection of 10 bacteria per cell and incubated as described previously (29). The viability of non-infected cells was determined by trypan blue exclusion. Diff-quick coloration was used in each experiment to control the quality of cells and the association of bacteria with cells.

**Nitric oxide (NO) response.** Production of nitric oxide (NO) by macrophages was evaluated indirectly by the colorimetric Griess method (14). Macrophage suspensions were prepared as described above and added to the wells of 24-well

plates. Supernatants were collected at 1, 2, 3, and 4 hours following bacterial infection and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until utilization. In some experiments, macrophages were incubated 1 hour with the infecting bacteria and then incubated with gentamycin to eliminate extra-cellular bacteria, as described previously (29). Supernatants were collected at 2 and 5 hours after addition of gentamycin. A volume of supernatant from each well was mixed with an equal volume of Griess reagent [1:1 (V/V) mixture of 0.1% *N*-1-naphthyl-ethylenediamine in distilled water and 1% sulfanilamide in chloridric acid 1.2N]. The absorbance at 540 nm was measured after a 15 min incubation in the dark, at room temperature. Nitrite concentrations were extrapolated from a nitrite standard curve.

**Respiratory burst activity of macrophages.** Respiratory burst activity in macrophages infected with bacteria was evaluated by reduction of nitroblue tetrazolium (NBT) due to reduced oxygen intermediates, leading to the formation of insoluble dark-blue formazan, and measured using a spectrophotometer.

Macrophage suspensions were seeded in wells of 96-well microplates, at a volume of 100  $\mu\text{l}$  per well, then infected and incubated for 45 min in the same conditions as described above. The reaction was stopped by addition of 100  $\mu\text{l}$  of 1N hydrochloride acid to each well. Microplates were centrifuged at 800X g for 10 min, the supernatant was eliminated and cells were washed twice with PBS. A volume of 150  $\mu\text{l}$  of 99.5 % v/v dimethylsulphoxide was added to each well and thoroughly mixed to recuperate the pellet. To increase the color intensity of the produced



formazan, 10  $\mu$ l of 1 N sodium hydroxide was added to each well. The optical density was measured at 655 nm in a spectrophotometer. Macrophages infected with opsonized zymosan A or PBS were used as positive and negative controls respectively.

**Oxidative burst of blood cells as measured by chemiluminescence.**

Oxidative burst produced by cells of blood inoculated with different strains was examined by chemiluminescence. This assay was conducted in white 96-well clear bottom microplates in a total volume of 200  $\mu$ l for each well. Luminol ( $2.5 \times 10^{-3}$  M) or lucigenin ( $2.5 \times 10^{-4}$  M) was added to fresh blood diluted once with 0.1 % gelatin HBSS, prior to their infection with  $0.5 \times 10^5$  opsonized or non-opsonized bacteria. HBSS and opsonized zymosan (0.1 mg/ml) were used as negative and positive controls respectively. The chemiluminescence produced following the reaction between lucigenin or luminol and reactive oxygen metabolites released by cells at 40°C was measured using a chemiluminometer (Labsystems Luminiskan EL). Measures were made at 5 minute intervals (integration time, 5 sec.).

**Cytokine expression in macrophages measured by RT-PCR.** Cytokine expression in macrophages infected with different strains was measured by RT-PCR. Total RNA was isolated from cell cultures of macrophages incubated for one hour with bacteria in the conditions described above, using TRIzol-reagent (Invitrogen, life technologies) according to the manufacturer's recommendations. Contaminating gDNA was digested with RNase-free DNase I (Invitrogen, life technologies) and its

concentration was determined by spectrophotometry at 260/280 nm. RNA was reverse transcribed using random hexamer [pd(N)6] primers with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen). Primers of different cytokines (IL1- $\beta$ , IL1r, IL6, IL8, MIP1- $\beta$ , iNOS) (Table 2) were used to detect the induction of these cytokines in macrophages. The number of PCR cycles for each cytokine was adjusted to non-saturated amplification conditions as described previously (12).

## RESULTS

**Nitric oxide production.** To better understand the role of certain bacterial virulence factors and host factors in the NO response of chicken macrophages, NO production was evaluated in macrophages infected with different APEC strains and isogenic mutants for P or type 1 fimbriae, O78, or K1 capsule, taking into account the presence or absence of extracellular bacteria, the opsonization state of the bacteria, and the time of contact of bacteria and macrophages.

**(i) NO response in chicken macrophages infected with different APEC strains peaks at 3 hours.** Unstimulated macrophages produced low levels of NO (0.5 to 1.8  $\mu\text{M}$ ) as measured at different incubation times. After incubation for 1 or 2 hours in the presence of both intracellular and extracellular bacteria, the NO levels measured in macrophages were low (5 – 67  $\mu\text{M}$ ). However, the nonpathogenic strain EC79 induced a significantly higher NO production than the APEC strains. Similar results were obtained after incubation for 2 or 5 hours in the presence of only

intracellular bacteria following treatment of macrophages with gentamycin (1.5 – 10  $\mu\text{m}$ ).

NO production peaked at 3 hours post infection, when bacteria were present both intracellularly and extracellularly (Fig. 1). At this time, NO production was always higher in macrophages infected with non-opsonized bacteria, than in those infected with opsonized bacteria (Fig. 1). As observed at earlier times post infection, the non-pathogenic strain EC79 induced a higher level of NO production than any of the three APEC strains ( $\chi$ 7122, MT78, and TK3), the difference being significant when bacteria were not opsonized (Fig. 1a).

**(ii) LPS is a potential inducer of NO in macrophages.** In absence of O78 antigen, the isogenic mutant  $\chi$ 7145 induced a weaker NO production than its wild type APEC strain  $\chi$ 7122, whereas no significant difference was observed between the wild type strain  $\chi$ 7122 and O1-, O26-, and O111-substituted mutants ( $\chi$ 7167,  $\chi$ 7168, and  $\chi$ 7193 respectively) (Fig. 1b).

**(iii) K1 capsule inhibits NO production whereas type 1 and P fimbriae have no effect.** In contrast to the wild type parent MT78, bacteria of mutant strain BEN2694 (K1) induced significantly higher levels of NO production, in the presence or absence of opsonization (Fig. 3c). On the other hand, no significant difference was observed between the NO level induced by wild type strain MT78 and that induced by its mutants DM34 (*fim*) and PA68 (*fimH*). Also, no significant difference was

observed between the NO level induced by the APEC strain TK3 and that induced by its *papG* mutant.

**Oxidative burst response in avian macrophages.** Oxidative response was measured using nitroblue of tetrazolium (NBT), a pale dye which is taken up by phagocytes. In presence of  $H^+$  ions from NADPH oxidation, NBT is reduced and forms a dark blue formazan inside the phagocytes. The intensity of coloration, which is proportional to the intensity of oxidative response, was measured by spectrophotometry.

**(i) APEC strain MT78, which adheres strongly to avian macrophages, induced the lowest oxidative response.** A high level of oxidative burst activity was obtained in macrophages stimulated with opsonized zymosan (Fig. 2). Non-pathogenic strain EC79 and the three APEC strains  $\chi$ 7122, MT78, and TK3, whether opsonized or not, induced low oxidative burst activity in macrophages. However, MT78 APEC strain induced the weakest level of oxidative burst, the difference versus the non-pathogenic strain being significant when bacteria were opsonized (Fig. 2).

**(ii) LPS, especially O26, in  $\chi$ 7122, and Fim and FimH and K1 in MT78 inhibit oxidative activity in macrophages.** As compared to their wild type strains, the mutant  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>) of  $\chi$ 7122 APEC (Fig. 2 b) and DM34 (*fim*) and PA68 (*fimH*) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>) mutants of MT78 APEC (Fig. 2c) induced a higher level

of respiratory burst, especially when bacteria were not opsonized. In contrast, the O26-substituted mutant ( $\chi$ 7168) induced less respiratory burst activity than its wild type parent strain.

No significant difference was observed between APEC strain TK3 and its mutant TK37G (*papG*), and APEC strain  $\chi$ 7122 and its O1- and O111-substituted mutants ( $\chi$ 7193 and  $\chi$ 7167) in their induction of respiratory burst activity in macrophages although the O-substituted mutants all induced a lower oxidative burst than the O78 mutant.

**Respiratory oxidative burst response in whole blood phagocytes.** The oxidative response in blood phagocytes was measured by chemiluminescence with lucigenin or luminol. The chemiluminescence response was positive with lucigenin although no response was detected with luminol.

In general, non-opsonized bacteria stimulated respiratory burst activity of blood cells to a greater extent than opsonized bacteria, as measured by lucigenin chemiluminescence (Fig 3, data for opsonized bacteria not shown). In contrast to the observation for macrophages, APEC strain MT78 stimulated an oxidative response in blood phagocytes to a much greater extent than the other APEC strains  $\chi$ 7122 and TK3 and the non-pathogenic strain EC79 (Fig. 3a).

**(i) Fim and K1 in MT78 and O1 in  $\chi$ 7122 induce a greater oxidative burst in blood phagocytes whereas O78 in  $\chi$ 7122 and PapG in TK3 inhibit it.** As observed in macrophages, the O78 mutant ( $\chi$ 7145) induced a far greater oxidative response than the parent strain  $\chi$ 7122, indicating that the presence of O78 inhibits this response in blood phagocytes. The O1-substituted mutant ( $\chi$ 7193) also induced a greater response, whereas the O26 mutant ( $\chi$ 7168) induced a similar response to the parent strain  $\chi$ 7122, indicating that O1 inhibits the oxidative response less than O78. In contrast to the observation in macrophages, in the absence of Fim (DM34), bacteria induced a weaker oxidative response in blood phagocytes than that induced by its wild type strain MT78 (Fig. 3). In contrast, in the absence of PapG, (TK37G) mutant strain activated blood cells to a greater extent than its respective wild-type parent strain TK3 (Fig. 3).

#### **Cytokine profiles in chicken macrophages infected with different strains.**

**(i) The three APEC strains and the non-pathogenic strain induced different cytokines in macrophages depending on their opsonization state.** Induction of some cytokines in macrophages was strain-dependant. The non-pathogenic strain EC79, whether opsonized or not, induced very little cytokine response. Similarly, the three APEC strains MT78,  $\chi$ 7122, and TK3 induced little or no IL-6 or iNOS. In contrast, the three APEC strains, whether opsonized or not, induced IL-8 and MIP-1 $\beta$ . On the other hand, IL-1 $\beta$  was induced only by MT78

APEC strain when opsonized but not by  $\chi$ 7122 or TK3. IL-1r was induced by MT78 and  $\chi$ 7122 but not by TK3 (Fig. 3).

**(ii) Type 1 fimbriae and K1 capsule are specific inductors for some cytokines.** In contrast to the wild-type strain MT78, bacteria of mutants DM34 (*fim*), PA68 (*fimH*), and BEN2694 (K1<sup>-</sup>) did not induce IL-1 $\beta$  when bacteria were opsonized, whereas when bacteria were not opsonized, only mutant strain PA68 (*fimH*) induced IL-1 $\beta$ . Also, compared to the wild type strain MT78, mutants PA68 (*fim*) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>) weakly induced IL-1r when opsonized, iNOS when non-opsonized, and MIP-1 $\beta$  in both conditions. On the other hand, induction of IL-6 and IL-8 did not appear to be affected by the presence or absence of these factors.

**(ii) The presence and the nature of LPS affect induction of some cytokines.** Neither APEC strain  $\chi$ 7122 nor its mutant  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>) bacteria induced IL-1 $\beta$ , whereas substitution of O78 in  $\chi$ 7122 APEC strain by O26, O111, or O1 in mutant strains  $\chi$ 7167,  $\chi$ 7168, and  $\chi$ 7193 respectively resulted in induction of IL-1 $\beta$  when bacteria were opsonized. On the other hand, IL-6 and iNOS were only induced in the absence of O78 and when bacteria were opsonized. When bacteria were not opsonized, IL-1r was highly induced by the APEC strain  $\chi$ 7122 in contrast to the rough mutant,  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>) and O-substituted mutants  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26), and  $\chi$ 7193 (O1) and IL-6 was not induced by the mutant  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>). Induction of IL-1 $\beta$ , IL-8, and iNOS and MIP-1 $\beta$  did not appear to be affected by the presence or absence of LPS (Fig. 3).

**(iii) PapG affects the induction of MIP-1 $\beta$ .** In contrast to the APEC strain TK3, in absence of PapG, mutant strain TK37G did not induce MIP-1 $\beta$ , whereas the induction of the other tested cytokines was the same in presence or in absence of PapG.

## DISCUSSION

Innate immune defenses play a primordial role in counteracting infections. In fact, the susceptibility of chicks to infectious diseases is related to functional immaturity of the innate defenses during the first week post-hatching (22, 40). In our previous study, we demonstrated that three APEC strains belonging to the different serotypes O1, O2, and O78 each induced specific patho-physiology and behaved differently during their interaction with complement and phagocytes (28, 29). The different behavior of APEC strains at the various steps of infection of macrophages, reflecting the presence of different surface structures, could result in the induction of distinct patterns of innate immune response. In this study, we focused on the NO, oxidative, and cytokine response induced by the different APEC strains as well as the role of bacterial virulence factors in the modulation of this response.

Macrophages exert a key role in specific and non-specific host defense. Stimulated macrophages elicit the appropriate immune response to bacteria by



inducing defense mechanisms as well as production of nitric oxide and reactive oxygen species and induction of cytokines that regulate inflammatory responses (31).

An important defense mechanism of mononuclear phagocytes is the L-arginine-dependent production of nitric oxide (NO). Chicken macrophages produce NO in an arginine-dependent manner, similar to mammalian macrophages (11) although the incomplete uric acid cycle in the chicken and consequent inability to synthesize arginine render the chicken particularly sensitive to arginine availability in diet.

Chicken macrophages produce nitric oxide as a defense mechanism against pathogen invasion, and chicken iNOS enzyme was the first non-mammalian iNOS cloned (17, 21). The iNOS enzyme is expressed only after activation by stimulants. In the present study, we examined whether nitric oxide was a constituent of the antimicrobial repertoire displayed by chicken macrophages against APEC strains. Since peritoneal macrophages were elicited with Sephadex that probably activated them, these cells were rested overnight prior to stimulation with different strains. It has been reported that the expression of iNOS mRNA by chicken macrophages peaks between 6 and 12 h after stimulation with LPS (17). Herein, we have demonstrated a high level of NO production at 3 hours post infection with total bacteria. After this incubation time, the media becomes cloudy, probably affecting the measurement of the optical density.

Non-pathogenic strain EC79 induced a higher level of NO production than the APEC strains. Since this strain was not able to persist in the host following experimental challenge (2, 25), nitric oxide could be one of the effector molecules involved in its elimination from the host, and lack of NO induction could be one of the mechanisms by which the pathogenic strains persist in the host. The finding that, in the presence of O78 antigen, APEC strain  $\chi$ 7122 induced NO production; is not surprising since the LPS from gram-negative bacteria is known to be a potent inducer of nitric oxide synthetase (26, 34). On the other hand, the finding that K1 capsule inhibited NO production suggests that this antigen could mask bacterial surface structures, such as the O antigen, that activate NO induction in macrophages. Similarly, Naslund et al. (30) found that capsulated virulent *Cryptococcus neoformans* failed to induce nitric oxide synthetase (NOS) in IFN- $\gamma$ -primed murine macrophages whereas a non-encapsulated mutant induced NOS. According to the authors, the presence of the polysaccharide capsule appears to mask the signal necessary for TNF- $\alpha$  secretion and subsequent NOS induction.

The P and type 1 fimbriae do not seem to be involved in NO induction in macrophages, since the appropriate mutants behaved similarly to their respective wild type strains. The presence of K1 capsule in these bacteria could interfere with the interaction between the fimbriae and macrophages and the role of the fimbriae in NO induction may be more apparent in absence of this capsule. Such fimbriae would not include type 1 fimbriae since the type 1 fimbriae mutants (Fim- and FimH-) behaved similarly to their wild type parent in their induction of NO.

Another function of macrophages is the respiratory burst, where toxic oxygen products, such as superoxide, hydrogen peroxide, singlet oxygen and hydroxyl radicals are released, resulting in oxidative microbicidal and cytotoxic properties. This respiratory burst is triggered by the NADPH-oxidase system, which is activated following the perturbation of the plasma membrane during phagocytosis or following the interaction between the cell surface and viable agents. In our study, macrophages infected with different APEC strains or a non-pathogenic strain showed a weak oxidative response as measured by NBT, compared to the positive control when macrophages were stimulated by opsonized zymosan. However, among the APEC strains, MT78 induced a weaker level of respiratory burst. Since this strain associates strongly with macrophages and resists their bactericidal effects (29), it may down regulate the induction of the bactericidal oxidative system to survive in phagocytes. This may be mediated by type 1 fimbriae, since in the absence of Fim or FimH, bacteria induced high levels of respiratory burst, especially when bacteria were opsonized. The nature of the O antigen seems also to affect the induction of respiratory burst since the O26 mutant induced less respiratory activity than its wild type strain O78 and O1 mutant.

During their invasion of the host, septicemic bacteria pass via the blood to reach the internal organs and other sites in the body. Chicken blood has many mechanisms to fight invasive bacteria, such as complement and phagocytes, especially monocytes and heterophils. In our previous studies, we demonstrated the

ability of bacteria to resist the bactericidal effects of complement (28) and heterophils (29) and to reach the blood and internal organs of infected chickens *in vivo* (28). In the present study, we have focused on ability of bacteria to resist respiratory burst of blood phagocytes, as measured by luminol- and lucigenin-chemiluminescence. Luminol enters the cell and reacts with hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) in the presence of myeloperoxidase, and thus its use would essentially measure the intracellular production of oxygen species (1). As luminol chemiluminescence detects combined oxidase-peroxidase activities involving myeloperoxidase (7), the lack of response observed in these assays with luminol-enhanced chemiluminescence may be due to the lack of myeloperoxidase system in chicken blood cells (16, 36, 37). Because of its high molecular weight, lucigenin cannot enter the cell and it reacts with the active oxygen species produced in the extracellular milieu (6). More precisely, lucigenin chemiluminescence reflects the activity of the NADPH-oxidase complex (32). In our study, lucigenin chemiluminescence responses were positive but varied depending on the infecting strain. Contrary to its weak oxidative activation in macrophages, APEC strain MT78 stimulated blood phagocytes to a much greater extent than the other APEC strains and the non-pathogenic strain. The difference in these results could be due to the difference in the nature of cells found in blood. The high oxidative response induced in the blood due to MT78 could be associated with the presence of such factors as type 1 fimbriae and K1 capsule, since in absence of these surface structures, mutants did not activate blood cells to the same extent as their wild type parent strain MT78. Bacteria of MT78 may avoid blood phagocyte activation in the host by the non expression of type 1 fimbriae and K1 capsule in blood, but may also

resist the bactericidal effects of these products. For *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, resistance to oxidative products is associated with the presence of a 59-kDA OMP (33) or *recA* (4). Carlson and Carpenter (5) reported that in *E. coli*, the *recA* product is more important than catalase in defense against the effects of hydrogen peroxide.

The most important strategy used by invasive bacteria is avoidance of, rather than resistance to, reactive oxygen intermediates, thus permitting the bacteria to enter the phagocyte without activating its microbicidal response. Our results suggest that O78 in  $\chi$ 7122 APEC strain and, to a lesser extent, PapG in TK3 APEC strain may down regulate oxidative burst activity as in their absence mutants activated blood cells to a greater extent than their respective wild-type strains. In presence of these surface structures, bacteria were weakly associated with phagocytes (29), hence the weak activation of blood cells observed in the present study is probably due to the weak interaction between bacteria and cells. Similarly, Tewari et al. (35) demonstrated that P fimbriated *E. coli* elicited a lower oxidative burst from neutrophils than nonfimbriated *E. coli* and this reduced response is attributed to PapG.

Determination of cytokine response of the host to infectious agents is important to understand the fundamental mechanisms of host resistance and disease pathogenesis. Cytokine induction, as a protective or pathological mechanism, is a direct response to the presence of an infectious agent (23). Excessive or insufficient production of cytokines may contribute significantly to the pathophysiology of

disease. Many studies have been carried out on the cytokine response in mammals, although such studies in chickens are still in their infancy. This is, to our knowledge the first study carried out on the cytokine response in chickens during APEC infection.

The three APEC strains and the non-pathogenic bacteria induced different patterns of cytokines in macrophages. The non-pathogenic strain EC79 induced only MIP-1 $\beta$  of the examined cytokines (Fig. 4). This could be due to the weak association of this strain with macrophages (data not shown). MIP-1 $\beta$  belongs to the group of C-C chemokines released by monocytes, and may play a role in the recruitment and accumulation of heterophils and lymphocytes at the sites of microbial infection, as observed for mycoplasma (20).

The APEC strains  $\chi$ 7122 and TK3 and non-opsonized MT78 did not induce IL-1 $\beta$  in macrophages. Similarly, it has already been shown that macrophages infected with another infectious agent, chicken anemia virus, produced less IL-1 $\beta$  and fewer Fc receptors (27). The ability to avoid IL-1 induction in macrophages could be an important mechanism used by APEC strains to survive in the host, since IL-1 $\beta$  is the most important proinflammatory cytokine produced by active macrophages to fight pathogens. In fact, IL-1 is able to induce other cytokines, such as the proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- $\alpha$ , and several chemokines, one of the major biologic effects of IL-6 being the induction of an acute-phase response which modulates the protein secretion pattern of the liver, the fever response, and secretion

of corticosteroids. IL-1 $\beta$  is an important proinflammatory cytokine with pleiotropic activities; being rapidly induced in LPS-treated chicken macrophages and reaching maximal levels within one hour post-treatment (39). Bacterial lipopolysaccharide (LPS) is one of many potential cytokine-inducing ligands and has been shown to engage specific receptors and stimulate defined signaling pathways (19, 24). In contrast, in our study, the presence of LPS in whole bacteria did not automatically induce IL-1 $\beta$  in macrophages at 1 hour post-infection. The fact that IL-1 $\beta$  was induced only by opsonized MT78 (O2) but not by other APEC strains or by  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26),  $\chi$ 7193 (O1) or by  $\chi$ 7122 (O78) means that nature of LPS and opsonization state could affect induction of IL-1 $\beta$ , but since the APEC strain TK3 (O1) and the mutant  $\chi$ 7193 (O1) of  $\chi$ 7122 have the same serotype but did not induce similarly IL-1 $\beta$  means also that other bacterial factors could interfere in the induction of IL-1 $\beta$  by LPS.

All tested APEC strains induced IL-8 in macrophages, in contrast to the non-pathogenic strain. IL-8 is considered a major chemotactic agent for the attraction of heterophils to the site of bacterial invasion (18). We have already demonstrated that APEC strains resist heterophils more effectively than the non-pathogenic strain and that type 1 fimbriae and K1 capsule, O78 antigen, and PapG seem to protect bacteria against killing by phagocyte cells, especially heterophils (29). Hence, the attraction of heterophils to an infection site due to the presence of IL-8 induced by the APEC bacteria would not prevent these bacteria from persisting. Our results indicate that the

examined virulence factors are not involved in the induction of IL8, rather in other mechanisms of resistance to phagocyte killing.

We also determined the role of other surface structures in the modulation of cytokine induction. In fact, Fim in MT78 and PapG in TK3 seemed to induce MIP-1 $\beta$  in macrophages, since there was no induction of this cytokine in their absence. To our knowledge, this is the first time that type 1 and P fimbriae have been implicated in the induction of MIP-1 $\beta$ .

Taken together, these results show that pathogenic bacteria can inhibit the expression of some cytokines. The absence of such cytokines in the first steps of infection could promote the spread of bacteria in the host and establishment of an infection.

Our previous results suggested that nonopsonic phagocytosis may, in certain circumstances, be more efficient than opsonic phagocytosis in chickens (29). The results of the present work showed that phagocytes were indeed more highly activated with nonopsonized bacteria than with opsonized bacteria. The intracellular pathway used by bacteria to associate with phagocytes could activate cells differently and may influence the degree to which pathogens are exposed to microbicidal mechanisms. Further investigation of the mechanisms of activation of chicken phagocytes is required to understand this phenomenon.



The innate immune response, as first line of defense, functions to limit infection until the acquired response is initiated, and also provides instructions for the acquired immune responses. Elucidation of the distinct patterns of innate immune response of APEC infection might be important in disease control. Our results demonstrated that the immune system combats different APEC strains in distinct ways. Some virulence factors such as O78 antigen, K1 capsule, and PapG appear to play an important role in modulation of the innate immune system. These immune mediators could be the best targets for vaccine and therapeutic interventions to enhance disease control.

## REFERENCES

1. **Allen, R. C.** 1986. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* **133**:449-93.
2. **Arné, P., D. Marc, A. Brée, C. Schouler, and M. Dho-Moulin.** 2000. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a *fimH* deletion. *Avian Dis* **44**:343-55.
3. **Brown, P. K., and R. Curtiss III.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11149-54.
4. **Buchmeier, N. A., C. J. Lipps, M. Y. So, and F. Heffron.** 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. *Mol Microbiol* **7**:933-6.
5. **Carlsson, J., and V. S. Carpenter.** 1980. The *recA+* gene product is more important than catalase and superoxide dismutase in protecting *Escherichia coli* against hydrogen peroxide toxicity. *J Bacteriol* **142**:319-21.

6. **Dahlgren, C., and G. Briheim.** 1985. Comparison between the luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes and of the myeloperoxidase-HOOH system: influence of pH, cations and protein. *Photochem Photobiol* **41**:605-10.
7. **Dahlgren, C., and O. Stendahl.** 1983. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **39**:736-41.
8. **Dho, M., and J. P. Lafont.** 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis* **28**:1016-25.
9. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**:299-316.
10. **Dho-Moulin, M., J. F. van den Bosch, J. P. Girardeau, A. Brée, T. Barat, and J. P. Lafont.** 1990. Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect Immun* **58**:740-5.
11. **Dietert, R. R., and K. A. Golemboski.** 1998. Avian macrophage metabolism. *Poult Sci* **77**:990-7.

12. **Dozois, C. M., E. Oswald, N. Gautier, J. P. Serthelon, J. M. Fairbrother, and I. P. Oswald.** 1997. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* **58**:287-300.
13. **Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh, and J. M. Fairbrother.** 1995. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol* **45**:297-309.
14. **Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, and S. R. Tannenbaum.** 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126**:131-8.
15. **Gross, W. B.** 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, pp.237-259. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and Man. CAB International, Wallingford, UK.
16. **Harmon, B. G.** 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult Sci* **77**:972-7.
17. **Hussain, I., and M. A. Qureshi.** 1997. Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poult Sci* **76**:1524-30.

18. **Kogut, M. H.** 2002. Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella enteritidis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **25**:159-72.
19. **Kovacs, E. J., D. Radzioch, H. A. Young, and L. Varesio.** 1988. Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J Immunol* **141**:3101-5.
20. **Lam, K. M.** 2002. The macrophage inflammatory protein-1beta in the supernatants of *Mycoplasma gallisepticum*-infected chicken leukocytes attracts the migration of chicken heterophils and lymphocytes. *Dev Comp Immunol* **26**:85-93.
21. **Lin, A. W., C. C. Chang, and C. C. McCormick.** 1996. Molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric-oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5'-flanking region. *J Biol Chem* **271**:11911-9.
22. **Lowry, V. K., K. J. Genovese, L. L. Bowen, and M. H. Kogut.** 1997. Ontogeny of the phagocytic and bactericidal activities of turkey heterophils and their potentiation by *Salmonella enteritidis*-immune lymphokines. *FEMS Immunol Med Microbiol* **19**:95-100.

23. **Lunney, J. K.** 1998. Cytokines orchestrating the immune response. *Rev Sci Tech* **17**:84-94.
24. **Manthey, C. L., P. Y. Perera, N. Qureshi, P. L. Stutz, T. A. Hamilton, and S. N. Vogel.** 1993. Modulation of lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression by *Rhodobacter sphaeroides* lipid A and SDZ 880.431. *Infect Immun* **61**:3518-26.
25. **Marc, D., P. Arné, A. Brée, and M. Dho-Moulin.** 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**:473-85.
26. **Marletta, M. A., P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf, and J. S. Wishnok.** 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. *Biochemistry* **27**:8706-11.
27. **McConnell, C. D., B. M. Adair, and M. S. McNulty.** 1993. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Dis* **37**:366-74.
28. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss III, P. K. Brown, P. Arné, A. Brée, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of

- virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**:536-40.
29. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss III, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**:494-503.
30. **Naslund, P. K., W. C. Miller, and D. L. Granger.** 1995. *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells. *Infect Immun* **63**:1298-304.
31. **Qureshi, M. A., C. L. Heggen, and I. Hussain.** 2000. Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev Comp Immunol* **24**:103-19.
32. **Steele, R. W.** 1991. Clinical applications of chemiluminescence of granulocytes. *Rev Infect Dis* **13**:918-25.
33. **Stinavage, P. S., L. E. Martin, and J. K. Spitznagel.** 1990. A 59 kiloDalton outer membrane protein of *Salmonella typhimurium* protects against oxidative intraleukocytic killing due to human neutrophils. *Mol Microbiol* **4**:283-93.

34. **Stuehr, D. J., and M. A. Marletta.** 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. Proc Natl Acad Sci U S A **82**:7738-42.
35. **Tewari, R., T. Ikeda, R. Malaviya, J. I. MacGregor, J. R. Little, S. J. Hultgren, and S. N. Abraham.** 1994. The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. Infect Immun **62**:5296-304.
36. **Van Nerom, A., M. Desmidt, R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1997. Lucigenin- and luminol-enhanced chemiluminescence in turkey monocytes. J Biolumin Chemilumin **12**:207-14.
37. **Van Nerom, A. E., R. Ducatelle, and F. Haesebrouck.** 1998. Oxygen radicals and nitric oxide production by turkey respiratory macrophages. Dev Comp Immunol **22**:407-16.
38. **Wannemuehler, M.** 1995. Bacterial resistance to cellular defense mechanisms, p. 97-169. In M. Wannemuehler (ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens, Second edition ed. ASM Press, Washington D.C.



39. **Weining, K. C., C. Sick, B. Kaspers, and P. Staeheli.** 1998. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem* **258**:994-1000.
  
40. **Wells, L. L., V. K. Lowry, J. R. DeLoach, and M. H. Kogut.** 1998. Age-dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil. *Dev Comp Immunol* **22**:103-9.

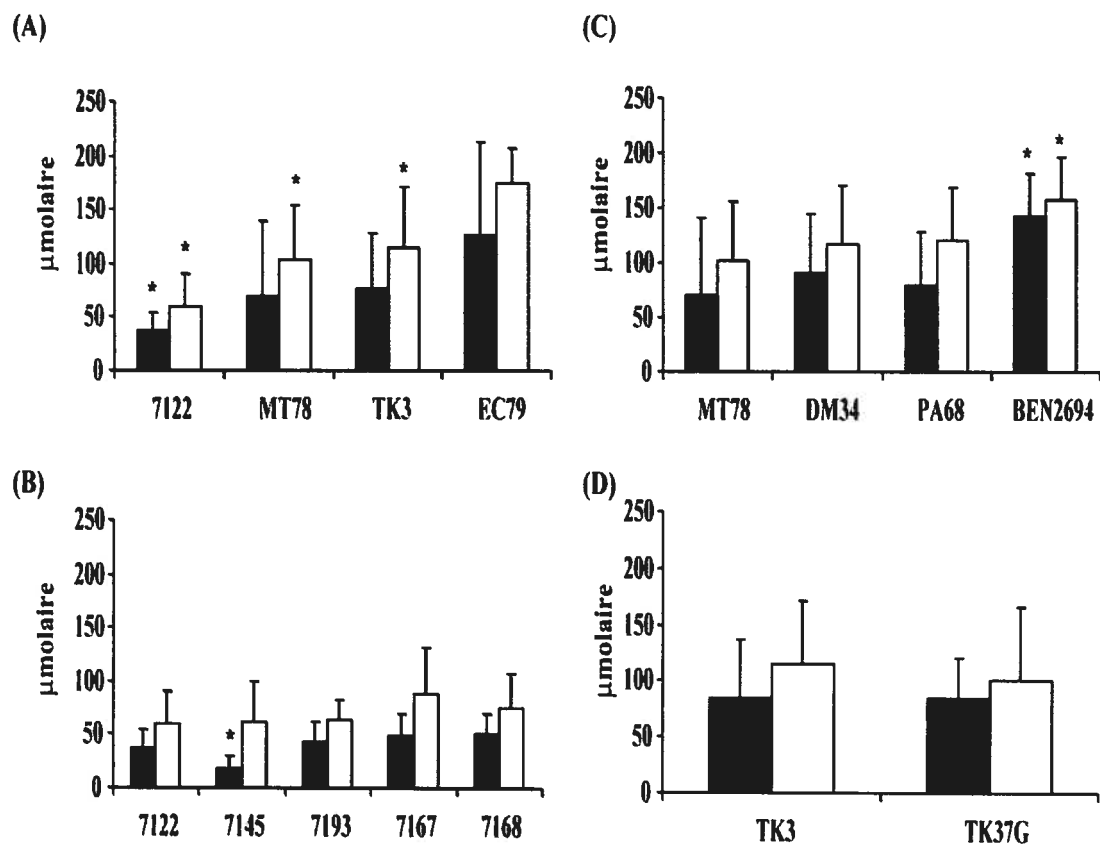
**Table 1. Bacterial strains used in this study.**

Wild-type strain	Mutant strain	Mutation	Genotype and characteristics <sup>a</sup>	References
<b>χ7122</b>			APEC O78:K80:H9, <i>gyrA</i> Nal <sup>R</sup>	(3)
	χ7167 (LPS)	O111	χ7179 <i>rfb</i> + (O111) prototroph by P1χ2963 lysate	(29)
	χ7168 (LPS)	O26	χ7179 <i>rfb</i> + (O26), prototroph by P1χ6206 lysate	(29)
	χ7193 (LPS)	O1	χ7179 <i>rfb</i> + (O1), prototroph by P1χ7112 lysate	(29)
	χ7145 (LPS)	O78-	χ7122 (χ289: <i>hisG-zee</i> ), <i>rfb</i> deleted by replacement with <i>E. coli</i> K-12 region at 45 min	(3)
<b>MT78</b>			APEC O2: K1: H+, Nal <sup>R</sup>	(10)
	PA68 (fimbriae)	FimH-	MT78 ( $\Delta$ <i>fimH</i> )	(2)
	DM34 (fimbriae)	Fim-	MT78 ( $\Delta$ <i>fim</i> )	(25)
	BEN2694 (capsule)	K1-	MT78 spontaneous K1-negative mutant, Nal <sup>R</sup>	(29)
<b>TK3</b>			APEC O1: K1: H7	(13)
	TK37G (fimbriae)	PapG-	<i>papG</i> mutant of strain TK3 produced by allelic exchange using pKNG101 based suicide vector, Km <sup>R</sup>	(29)
<b>EC79</b>			Non pathogenic <i>E. coli</i> (O2, K-)	(8)

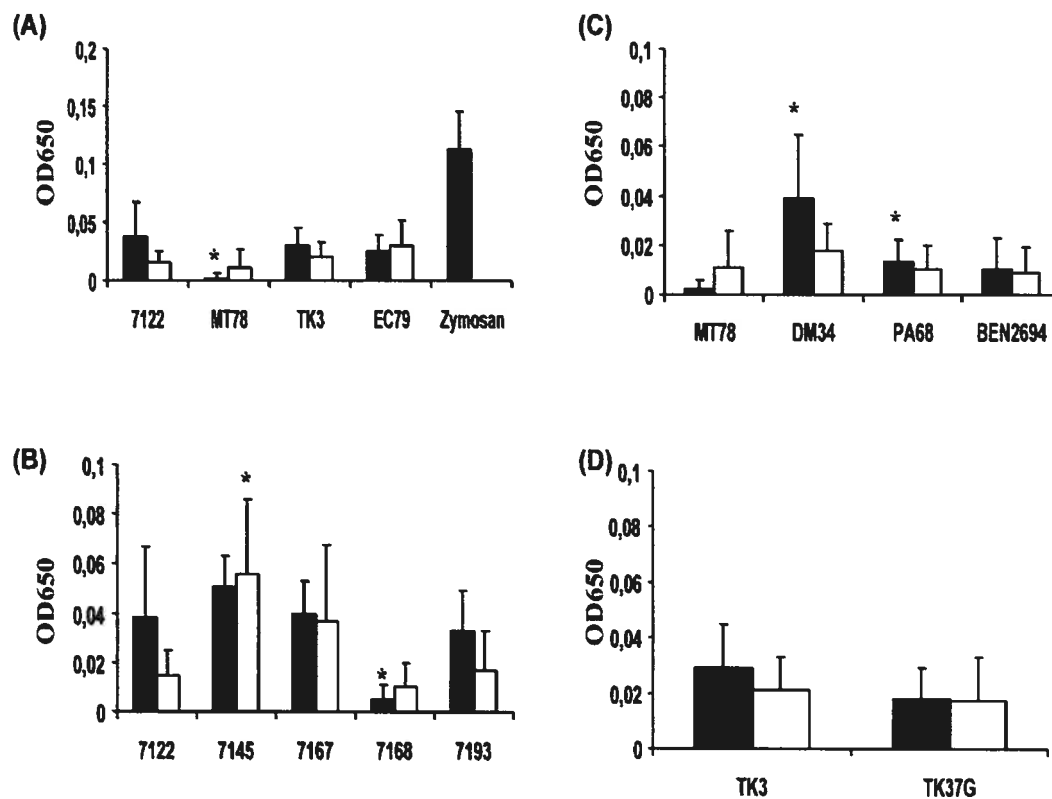
<sup>a</sup> Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol ; Km, kanamycin ; Nal, nalidixic acid ; Tc, tetracycline.

**Table 2. Primers used for RT-PCR analysis of macrophage chicken mRNAs**

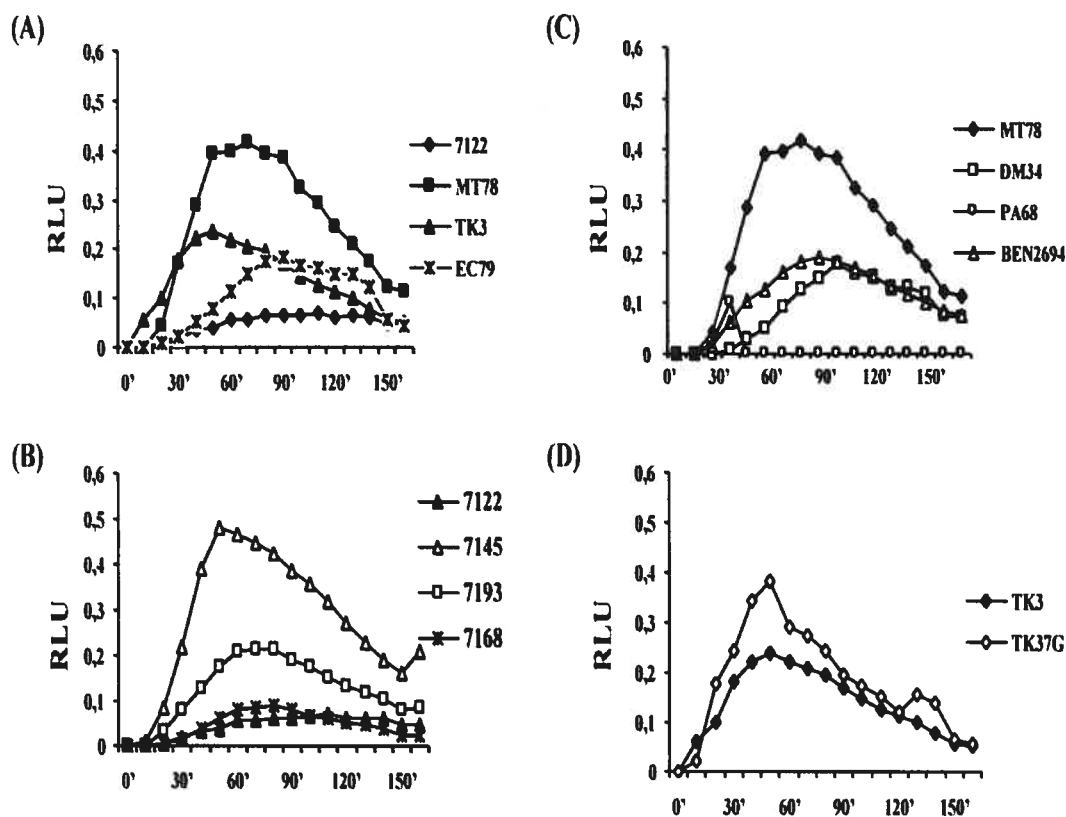
<b>Target</b>	<b>Primer</b>	<b>Sequence</b>	<b>Accession no.</b>
<b>28S</b>	F	5'-AGT GAG GCT CAA CAT TGC GCT-3'	X59733
	R	5'-GTA CTC GGT ACA TAC GAG A-3'	
<b><math>\beta</math>-actin</b>	F	5'-CTG GCC GTG ACC TGA CGG ACT AC-3'	L08165
	R	5'-TGT GGT ACC ACC AGA CAG C-3'	
<b>iNOS</b>	F	5'-CCC AGC TGG TAA CAG CGG AA-3'	U46504
	R	5'-CTG TTC CTG GGC CAA TAA GA-3'	
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	F	5'-AGT GAG GCT CAA CAT TGC GCT-3'	Y15006
	R	5'-GTA CTC GGT ACA TAC GAG A-3'	
<b>IL-1R</b>	F	5'-CCA GTT CAG AAC ATT CGT GG-3'	M81846
	R	5'-TGT CCG ATG AGT ACA AGC AGC-3'	
<b>IL-6</b>	F	5'-TGA CGA AGC TCT CCA GC-3'	AJ250838
	R	5'-TCT CTG GTT CCT GAA ACG-3'	
<b>IL-8</b>	R	5'-CCT CAG AGA GGC AGC TTT CTG-3'	AJ009800
	F	5'-TGC AAT TAA CAT GAG GCA CCG T-3'	
<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	R	5'-TGG GTT CTG ACC CGC CAG A-3'	L34553
	F	5'-GGA CAT TTT CAG TCT CTC AGG-3'	



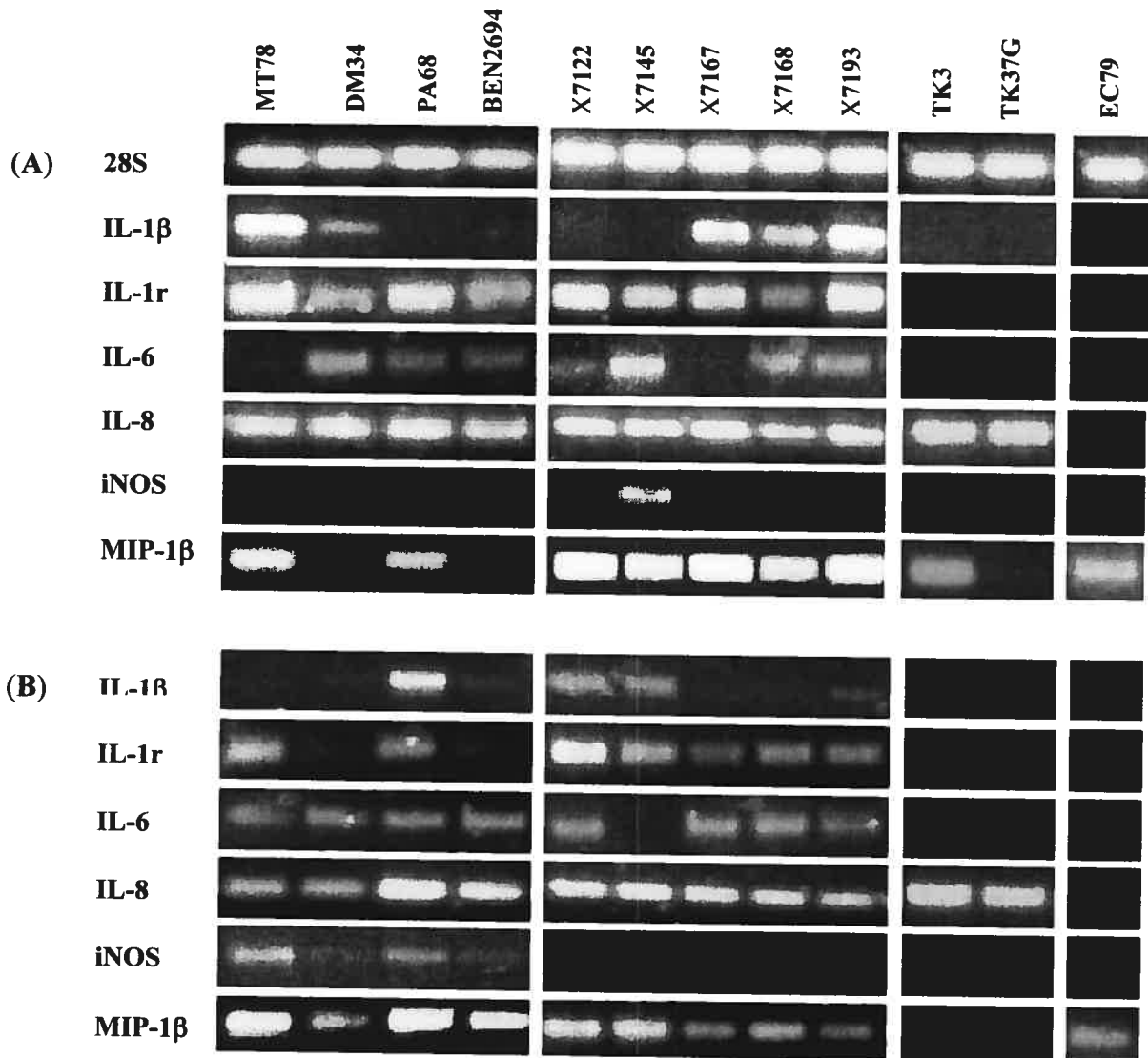
**FIG. 1.** Nitric oxide induction by different strains opsonized (■) or not (□) in macrophages at 3 hours postinfection. (A) Wild-type APEC strains ( $\chi$ 7122, MT78, and TK3) and the non pathogenic strain EC79, (B) APEC strain c7122 and its LPS mutants  $\chi$ 7145 (O78-),  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26), and  $\chi$ 7193 (O1), (C) APEC strain MT78 and its mutants DM34 (Fim-), PA68 (FimH-), and BEN2694 (K1-), (D) APEC strain TK3 and its mutant TK37G (PapG-).



**FIG. 2.** Oxidative burst measured by NBT induced by different strains opsonized (■) or not (□) in macrophages at 1 hour postinfection. (A) Wild-type APEC strains ( $\chi$ 7122, MT78, and TK3) and the non pathogenic strain EC79, (B) APEC strain  $\chi$ 7122 and its LPS mutants  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>),  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26), and  $\chi$ 7193 (O1), (C) APEC strain MT78 and its mutants DM34 (*fim*), PA68 (*fimH*), and BEN2694 (K1<sup>-</sup>), (D) APEC strain TK3 and its mutant TK37G (PapG<sup>-</sup>).



**FIG. 3.** Respiratory burst response in blood cells measured by chemiluminescence with lucigenin. (A) Wild-type APEC strains ( $\chi$ 7122, MT78, and TK3) and the non pathogenic strain EC79, (B) APEC strain  $\chi$ 7122 and its LPS mutants  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>),  $\chi$ 7168 (O26), and  $\chi$ 7193 (O1), (C) APEC strain MT78 and its mutants DM34 (Fim<sup>-</sup>) and BEN2694 (K1<sup>-</sup>), (D) APEC strain TK3 and its mutant TK37G (PapG<sup>-</sup>).



**FIG. 4.** Profiles of cytokine induction in macrophages infected 1 hour with different strains opsonized (A) or not (B), measured by RT-PCR. APEC strain MT78 and its mutants DM34 (*fim*), PA68 (*fimH*), and BEN2694 (K1<sup>-</sup>); APEC strain  $\chi$ 7122 and its LPS mutants  $\chi$ 7145 (O78<sup>-</sup>),  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26), and  $\chi$ 7193 (O1); APEC strain TK3 and its mutant TK37G (PapG<sup>-</sup>), and the non-pathogenic strain EC79.



## **IV. DISCUSSION**



L'objectif de cette étude était de déterminer le rôle des facteurs de virulence des APEC dans la colibacillose en utilisant des mutants isogéniques de différents facteurs de virulence de trois souches APEC appartenant aux sérotypes O1, O2, et O78. L'approche adoptée était d'étudier le comportement des différentes souches à différentes étapes importantes de l'infection. La virulence des différentes souches a tout d'abord été mesurée *in vivo* en inoculant des poulets via les sacs aériens, et par la suite pour comprendre les mécanismes de pathogénicité des souches APEC, nous avons testé les différentes souches, *in vitro*, pour leur capacité à résister au système immunitaire inné, essentiellement au complément et aux phagocytes. Finalement, la mesure de la réponse biochimique de l'hôte à l'infection nous a permis de se faire une idée sur la façon dont les APEC modulent la réponse de l'hôte durant l'infection.

Les APEC, appartenant au groupe des bactéries systémiques, envahissent les tissus extra-intestinaux des poulets infectés. Durant leur processus d'infection, les bactéries pathogènes doivent affronter, par un mécanisme qui leur est propre, la première ligne de défense innée de l'hôte qui peut leur être fatale. Le mécanisme par lequel les APEC échappent au système immunitaire de l'hôte est peu connu. Plusieurs facteurs de virulence ont été associés à ces souches mais leur implication dans ce processus n'est pas encore clairement élucidée. L'extrapolation à partir des résultats des mammifères n'est pas appropriée à cause de la particularité du système immunitaire des oiseaux qui est beaucoup plus proche de celui des reptiles (Montali, 1988). Notre étude, qui est la première dans son genre, détermine le rôle des différents facteurs de virulence connus (sérotipe O, les fimbriae de type 1 et P, le

curli, la Tsh, et le plasmide pColV) ou inconnu (la région 0-min du chromosome) des APEC appartenant aux sérogroupes les plus dominants (O1, O2 et O78) dans la pathogénie en utilisant des mutants isogéniques de ces différents facteurs de virulence.

Le rôle des différents facteurs de virulence de *E. coli* dans des infections systémiques a été évalué dans plusieurs modèles *in vivo* (Russo, 2002). Les résultats des différentes études ont démontré que les facteurs importants dans la survie des bactéries dans l'hôte sont la capsule et le sérotype O, leurs importances relatives dépendent des sites d'infection. La capsule K54 augmente la virulence des *E. coli* dans les infections intra-péritonéales et intra-musculaires ainsi que dans des abcès chez la souris, alors que la capsule K1, contribue à la pathogénèse des méningites néonatales. Contrairement au sérotype O18 qui joue un rôle mineur dans l'induction des méningites, le sérotype O4 permet aux souches ExPEC de survivre dans l'hôte.

Dans cette étude, pour déterminer l'implication des différents facteurs de virulence dans la pathogénicité, la capacité des bactéries à se disséminer dans le tractus respiratoire et les organes internes des poulets a été évaluée *in vivo* en inoculant respectivement chacune des trois souches APEC  $\chi$ 7122, MT78 et TK3 et leurs mutants correspondants aux poulets via leurs sacs aériens. Les résultats de nos précédentes études avaient montré que les mutants testés DM34 (*fim*) (Arné *et al.*, 2000), PA68 (*fimH*) (Marc *et al.*, 1998) et  $\chi$ 7273 (*tsh*) (Dozois *et al.*, 2000) étaient généralement aussi virulents que leurs souches mères respectives, de même pour le

mutant  $\chi 7274$  (pAPEC-1), même s'il persistait moins bien que sa souche mère (Dozois *et al.*, 2000). Dans cette présente étude, les signes cliniques de la colibacillose ont été reproduits avec les trois souches APEC. Tous les organes internes et les fluides corporels étaient colonisés suite à l'inoculation des poulets avec chacune des trois souches APEC. Contrairement à leurs souches mères respectives, les mutants  $\chi 7245$  (O78<sup>-</sup>) et BEN2694 (K1<sup>-</sup>) persistaient moins bien dans les liquides corporels (liquide péricardite et le sang) et les organes internes (poumons, sacs aériens, rate et foie). Par contre, il n'y avait aucune différence entre le mutant TK37G (*papG*) et sa souche mère TK3 dans leur capacité à coloniser les organes internes et les liquides corporels. Cependant, des différences significatives étaient apparentes au niveau des lésions, le mutant *papG* induisait en effet des lésions moins sévères dans le sac aérien et le foie que la souche mère.

Ensemble, les résultats des infections *in vivo* montrent que le LPS O78, la région 0-min chez la souche  $\chi 7122$ , et la capsule K1 chez la souche MT78 permettent aux souches APEC d'atteindre le flux sanguin et les organes internes des poulets. D'autre part, l'incapacité du mutant  $\chi 7274$  (pAPEC-1) à persister dans les poulets infectés démontrent que d'autres mécanismes sont impliqués dans le processus pathogénique. L'un de ces mécanismes pourrait être la capacité d'acquisition du fer, puisque ce mutant a perdu son système d'acquisition du fer impliquant l'aérobactine (Dozois *et al.*, 2000).

La capacité des ExPEC à induire une infection systémique réside principalement dans leur capacité à faire face à la réponse innée de l'hôte. Le système du complément est la première ligne de défense contre les microorganismes invasifs. Les *E. coli* aviaires isolés de bactériémies sont fréquemment résistants à l'effet bactéricide du sérum (Dozois *et al.*, 1992; Wooly *et al.*, 1992) et la corrélation entre la virulence bactérienne et la résistance au sérum a déjà été démontrée (Dozois *et al.*, 1992; Ellis *et al.*, 1988; Gross, 1994). Cependant, le rôle des facteurs de virulence dans la résistance au sérum est le plus souvent spéculatif et le mécanisme de résistance à l'activité bactérienne au complément n'a pas encore été identifié.

Nos résultats ont confirmé que les trois souches APEC testées, MT78, TK3 et  $\chi$ 7122 sont bien résistantes au sérum (Dozois *et al.*, 2000; Pourbakhsh *et al.*, 1997c). Notre étude a montré que les facteurs de virulence qui permettent aux souches APEC de résister au complément sont essentiellement la capsule K1 et le sérotype O78. Les capsules polysaccharidiques des *E. coli* rendent les bactéries résistantes au sérum en interagissant avec les activateurs C3b dans les voies classique et alterne du complément. La résistance au sérum des isolats aviaires a souvent été associée à la présence de la capsule K1. En effet, Pourbakhsh *et al.* (1997c) avaient montré une corrélation entre la présence de la capsule K1 et les effets bactéricides du sérum chez les souches APEC. Dans cette présente étude, la sensibilité du mutant K1 et la résistance de sa souche complémentée au sérum confirment le rôle de la capsule K1 dans la résistance de la souche MT78 au complément.

L'absence de l'antigène O78 ou sa substitution par les antigènes O1 ou O26 rend la souche APEC  $\chi$ 7122 sensible au sérum. La résistance au sérum peut être liée à la présence de certaines chaînes polysaccharidiques de l'antigène O (Stawski *et al.*, 1990). En effet, la résistance à l'action du complexe d'attaque membranaire (CAM) est fréquemment observée chez les bactéries de phénotype lisse. Sachant que les LPS des bactéries Gram-négatives sont étroitement associés aux OMPs majeures (porines) (Pages *et al.*, 1990; Sen et Nikaido, 1991), il est probable que la longueur des chaînes LPS détermine l'accessibilité du complément aux composés bactériens tels que les porines et que l'efficacité de la fixation du complément soit aussi liée à la nature des sucres du LPS. Néanmoins, la présence de longues chaînes LPS de type lisse n'est pas suffisante pour la résistance au sérum chez tous les sérotypes O. En testant différents sérotypes O, Pluschke *et al.* (1983) et Pluschke et Achtman (1984) avaient montré que le polysaccharide O1 ne contribuait pas à la résistance au sérum d'une souche de *E. coli* K1. En effet, comparativement aux LPS O7 ou O18, le LPS O1 fixait plus efficacement le complément que les autres LPS. Par extrapolation, nous pouvons supposer que le LPS O1, seul, ne protégerait pas la souche APEC TK3 (O1:K1) contre l'effet bactéricide du sérum.

Chez les souches septicémiques, la capsule K1 n'est pas toujours requise pour la résistance au sérum (Cross *et al.*, 1984). Nos résultats ont montré que la souche  $\chi$ 7122 exprimant le LPS O78 était résistante au sérum en dépit de l'absence de la capsule K1. Par contre chez la souche  $\chi$ 7193, contrairement au LPS O78, le LPS O1 ne protégeait pas contre l'effet bactéricide du sérum. Par conséquent, la capsule K1

n'est probablement requise que pour protéger les souches ayant certains antigènes LPS O, tels que O1 et O2, mais pas celles ayant l'antigène LPS O78. Ceci expliquerait l'association spécifique de la capsule K1 aux sérotypes O1 et O2 souvent rapportée chez les souches APEC (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

L'implication des facteurs d'adhésion dans la résistance des bactéries à l'effet bactéricide du complément n'est pas connue. Bien que certains auteurs aient associé la résistance au sérum des souches APEC à la présence du fimbriae de type 1 (Dozois *et al.*, 1992; Wooly *et al.*, 1992), nos résultats ont au contraire montré qu'en utilisant des mutants isogéniques, le FimH ou le fimbriae de type 1 semblent jouer un rôle mineur dans la résistance au sérum. En effet, en absence de ces facteurs, les souches mutantes PA68 et DM34 étaient toujours résistantes au sérum et le mutant BEN2694 (K1<sup>-</sup>) était sensible au sérum en dépit de la présence de FimH et du fimbriae de type 1. Le fimbriae P ne semble également pas être impliqué dans la protection des bactéries de l'effet léthal du complément. Malgré l'absence de PapG, la souche mutante TK37G était aussi résistante au sérum que la souche parente TK3.

Nos résultats ont également démontré que l'inactivation de *csgA*, qui code pour la sous-unité curli, n'affecte pas la résistance des bactéries au sérum. Par conséquent, il ne semble pas y avoir de lien entre la capacité du curli à fixer les protéines du sérum (Olsèn *et al.*, 1989) et la résistance au sérum. Nous avons également confirmé que *tsh* est localisé sur le plasmide pAPEC-1 et qu'il ne contribuait pas de façon significative à la résistance de la souche  $\chi$ 7122 au complément (Dozois *et al.*, 2000).

La résistance des bactéries au sérum a souvent été associée à la présence des plasmides du groupe d'incompatibilité FII qui codent le plus souvent pour des OMPs (Taylor, 1995). Chez les souches APEC, plusieurs OMPs (TraT, OmpA et Iss) sont associées à la résistance au sérum (Pfaff-McDonough *et al.*, 2000). Nos résultats de PCR ont montré, au contraire, que les gènes *iss* et *traT* étaient présents aussi bien chez les souches résistantes que chez les souches sensibles au sérum. Par conséquent, la présence de ces gènes chez les mutants K1, sérotype O et 0-min ne protégeaient pas ces bactéries de l'effet bactéricide du sérum. À l'exception des autres souches testées dans cette étude, le mutant  $\chi$ 7274 (pAPEC-1) était *iss*-négatif mais *traT*-positif. L'absence de *iss* chez ce mutant montre que le gène *iss* est bien localisé sur le plasmide pAPEC-1, tel que déjà décrit pour le plasmide ColV-IK94, mais qu'il n'est pas lié au plasmide qui contiendrait *traT* (Binns *et al.*, 1979; 1982).

Brown et Curtiss (1996) avaient montré que la région 0-min du chromosome de la souche APEC  $\chi$ 7122 était impliquée dans la virulence. Nos résultats avaient montré que le mutant  $\chi$ 7146, dont la région 0-min a été remplacée par son équivalent chez *E. coli* K12, était sensible au sérum mais toujours positif aux gènes *iss* et *traT*. Aucun gène de virulence connu n'a été décrit dans cette position (Brown et Curtiss, 1996). Cette région pourrait coder pour une OMP non identifiée, qui protégerait la bactérie de l'effet bactéricide du complément (Nolan *et al.*, 1992) ou pourrait coder pour une protéine régulatrice de l'expression des facteurs de virulence impliqués dans la résistance au sérum (Nagy *et al.*, 2002).

Bien que les mutants  $\chi$ 7193,  $\chi$ 7168,  $\chi$ 7145, et  $\chi$ 7146 de la souche  $\chi$ 7122 et BEN2694 de la souche MT78 étaient sensibles au sérum, ils l'étaient moins que la souche contrôle 862. Ceci pourrait être dû à la présence chez ces souches d'autres structures de surface telles que Iss et TraT qui ne sont pas présentes chez la souche contrôle 862. Selon certains auteurs, les produits de *iss* et *traT* bloqueraient le fonctionnement du complexe d'attaque membranaire terminal plutôt que sa formation (Binns *et al.*, 1982) et par conséquent pourraient jouer un rôle d'appui contre son effet létal. Aussi, Dozois *et al.* (2000) avaient montré que la présence du plasmide pAPEC-1 chez la souche K-12 augmentait son habilité à survivre dans le sérum d'au moins 100 fois.

En dépit de l'absence de macrophages résidants dans les poumons et les sacs aériens des poulets sains, l'infection entraîne rapidement un influx d'hétérophiles comme première ligne de défense cellulaire, suivi de macrophages (Ficken et Barnes, 1989; Ficken *et al.*, 1986; Toth *et al.*, 1987; Toth et Siegel, 1986). Dans le but de déterminer les mécanismes mis en œuvre par les APEC pour se protéger de l'effet bactéricide des phagocytes, nous avons mesuré la résistance des souches aux phagocytes *in vitro* sur des cultures primaires d'hétérophiles et de macrophages en évaluant le comportement des bactéries à différentes étapes spécifiques de la phagocytose, tels que l'opsonisation, l'attachement, l'internalisation et la survie.



Les bactéries colonisent les différentes surfaces de l'hôte en adhérant aux surfaces épithéliales par leurs fimbriae. Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la souche APEC MT78 adhérait aux cellules de la trachée et du pharynx du poulet. Ses mutants DM34 (*fim*) et PA68 (*fimH*), qui respectivement ne produisent pas le fimbriae de type 1 ou l'adhésine FimH, étaient par contre incapables d'adhérer à ces cellules (Arné *et al.*, 2000; Marc *et al.*, 1998). De même, nos résultats ont montré que MT78 s'associait en grand nombre aux phagocytes. En absence de l'opsonisation, le fimbriae de type 1 promeut l'adhésion aux phagocytes par l'interaction lectine-carbohydate (Ofek et Sharon, 1988). Les expériences réalisées en absence de l'opsonisation avec le complément nous ont permis de distinguer entre la phagocytose médiée par les fimbriae et celle médiée par le complément. L'étude de la phagocytose non-opsonique est importante, car l'opsonisation pourrait masquer les événements liés aux fimbriae qui sont importants dans des conditions où l'activité opsonique est affaiblie (Silverblatt *et al.*, 1979; Björkstén et Wadström, 1982). En absence du fimbriae de type 1, les bactéries des mutants PA68 (*fimH*) et DM34 (*fim*) s'associaient en faible nombre aux macrophages et l'opsonization avait un faible effet sur elles, probablement à cause de la présence de la capsule K1. Selon Horwitz et Silverstein (1980), le sérum non-immun opsonise faiblement les souches avec un antigène K, ce dernier préviendrait l'association par son hydrophobicité et sa charge négative. En effet, la souche mutante K1 était hautement associée aux phagocytes. Il est probable que le rôle de la capsule K1 dans l'association pourrait être plus évident en absence du fimbriae de type 1. L'utilisation d'un double mutant K1 et *fim* pourrait aider à répondre à cette question. Il serait aussi intéressant d'examiner le rôle des

différents variants du fimbriae de type 1 présents chez d'autres sérotypes des APEC, tel que le O78, dans l'adhérence aux phagocytes. Ces variations dans la protéine FimA pourrait affecter l'affinité de la fixation de l'adhésine du fimbriae de type 1 (Madison *et al.*, 1994). Sur la base de leurs différences sérologiques, des séquences nucléotidiques et de la composition en acides aminés des sous unités FimA, différents variants apparentés au fimbriae de type 1 ont été décrits chez *E. coli*. Quatre régions variables ont été retrouvées dans la séquence de *fimA* du fimbriae de type 1 de la souche aviaire MT78 (O2:K1), dont un fragment spécifique à la majorité des souches O2 (Marc et Dho-Moulin, 1996).

Certaines souches APEC expriment l'adhésine du fimbriae P, mais son implication dans le processus pathogénique n'est pas encore élucidée (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). À l'instar des résultats de Tewari *et al.* (1994) sur un mutant *papG* d'une souche humaine de sérotype O6:K5:H<sup>-</sup>, nos résultats ont montré que le mutant TK37G (*papG*) était beaucoup plus associé aux phagocytes, spécialement aux macrophages, que la souche sauvage TK3. La faible association des bactéries aux phagocytes pourrait être le résultat d'une combinaison de plusieurs facteurs de virulence qui préviendraient l'association. Parmi ces facteurs, la capsule K1, tel que démontré chez la souche MT78, réduit l'association des bactéries aux phagocytes. Par conséquent, le rôle du fimbriae P chez la souche TK3 (O1:K1) pourrait être plus apparent en absence de la capsule K1. Le fimbriae P serait l'un des mécanismes utilisés par les souches APEC pour survivre au système immunitaire de l'hôte. En effet, la présence de ce fimbriae chez la souche APEC TK3, permettrait aux bactéries

d'éviter les phagocytes par l'effet de répulsion du fimbriae de type P induit par les propriétés électrostatiques de l'adhésine PapG, comme déjà décrit chez les souches de *E. coli* humaines (Tewari *et al.*, 1994) ou par l'absence de récepteurs glycolipides du fimbriae P sur les cellules hôtes (Svanborg-Edén *et al.*, 1984; 1987).

La souche APEC  $\chi$ 7122 s'associait faiblement aux phagocytes, même opsonisée. De même, Rosenberd-Arska *et al.* (1985) avaient noté que la souche humaine O78:K80 était faiblement associée aux phagocytes quant elle était traitée avec du sérum non-immun; pour une opsonisation efficace, la souche nécessitait par contre des anticorps spécifiques. Dans cette étude, nous avons montré que la délétion du locus *rfb* de l'antigène O78 ou la substitution de l'antigène O78 par des antigènes des autres sérotypes (O1, O26, et O111) chez la souche  $\chi$ 7122 permettaient aux bactéries de s'associer en plus grand nombre aux phagocytes, particulièrement quand les bactéries étaient opsonisées. De même, Burns et Hull (1999) ont montré qu'en absence de l'antigène O75, la souche uropathogène O75:K5 était plus fortement phagocytée par les polymorphonucléaires (PMNs) que la souche sauvage. Par conséquent, l'accessibilité de l'opsonine à la surface bactérienne et l'efficacité de la fixation du complément semblent dépendre de la présence et la composition en sucres du lipopolysaccharide (LPS). En effet les différents antigènes O testés (O1, O26, O111 et O78) diffèrent dans leur composition en sucres (Gupta *et al.*, 1992; 1995; Jansson *et al.*, 1987; Manca *et al.*, 1996).

La faible association des mutants Tsh, pAPEC-1 et curli de la souche APEC  $\chi$ 7122 aux phagocytes suggère la faible importance des structures de surface Tsh et curli dans l'association des bactéries aux phagocytes pour la souche  $\chi$ 7122. Nos résultats sur curli ne confirment pas ceux de certains auteurs qui ont démontré que les *E. coli* produisant des curli ont la capacité de se fixer de façon beaucoup plus importante aux CMH-1 et  $\beta_2$ m humain (Olsèn *et al.*, 1998) et murin (Johansson *et al.*, 2001) que leurs mutants déficients en curli. Les différences dans les résultats obtenus pourraient s'expliquer par la présence de certaines structures de surface chez la souche APEC  $\chi$ 7122, telle que la capsule K80 (Brown et Curtiss, 1996), qui pourrait prévenir l'interaction des curli au CMH-1.

Plusieurs micro-organismes intracellulaires sont capables d'infecter les phagocytes professionnels durant leur processus infectieux de l'hôte (Czuprynski, 1988). Concernant les APEC, les bactéries des isolats hautement pathogènes étaient souvent observées au contact des macrophages ou carrément à l'intérieur des macrophages des sacs aériens et des poumons des poulets infectés et de plus elles paraissaient intactes (Pourbakhsh *et al.*, 1997a). Dans cette présente étude, la viabilité des bactéries associées aux hétérophiles et aux macrophages a été déterminée *in vitro*, par l'habilité des bactéries à exclure des colorants fluorescents à une heure post-infection. Les différents profils d'infection observés suggèrent que les différents facteurs de virulence des trois souches APEC permettent aux bactéries de résister au système immunitaire inné par des mécanismes différents. Nos résultats démontrent que plusieurs des facteurs testés, entre autres le fimbriae de type 1 et la capsule K1

chez la souche MT78, l'antigène O78 et la région 0-min chez la souche  $\chi$ 7122, ainsi que le PapG chez la souche TK3, semblent protéger les bactéries de l'effet bactéricide des phagocytes, spécialement des hétérophiles, à une heure de contact.

Le rôle du fimbriae de type 1 dans la pathogénicité est encore controversé. Nos résultats des tests *in vitro* sont en accord avec ceux des tests *in vivo* qui ont révélé que le mutant DM34 (*fim*) était moins capable de survivre dans les poumons des poulets que la souche mère MT78 (Marc *et al.*, 1998). Il apparaît donc que le fimbriae de type 1, quand il est exprimé, pourrait promouvoir l'association de la bactérie aux phagocytes, mais pourrait néanmoins protéger les bactéries associées aux phagocytes par un mécanisme qui n'est pas encore connu. L'adhésine FimH ne semble pas être impliquée dans cette protection car le mutant *fimH* était aussi résistant aux phagocytes que la souche mère.

En ce qui concerne l'antigène O78, la capsule K1 et la région 0-min du chromosome, nos résultats de viabilité des bactéries associées aux phagocytes sont en accord avec ceux de l'*in vivo* sur des poulets inoculés, dans les quels on a trouvé que les mutants des facteurs suscités étaient moins invasives que leurs souches mères respectives. Les facteurs de virulence suscités et l'adhésine PapG pourraient moduler les fonctions antimicrobiennes des macrophages et des hétérophiles. En effet, Tewari *et al.* (1996) ont démontré que contrairement à sa souche mère, le mutant *papG* induisait une réponse oxydative élevée chez les neutrophiles.

Plusieurs bactéries se protègent des mécanismes de défense de l'hôte en s'adaptant au milieu intracellulaire des phagocytes. Le plus souvent en parasitant les phagocytes mononucléaires qui ont une durée de vie prolongée (Russell, 2000). Des facteurs de virulence connus ou inconnus semblent permettent aux bactéries de se multiplier et de persister dans les phagocytes. Dans notre présente étude, la persistance intracellulaire des bactéries a été testée dans les macrophages. Les facteurs de virulence testés semblent jouer un rôle limité dans la persistance des bactéries dans les macrophages. En effet, les mutants se comportaient de façon similaire que leurs souches mères. Cependant, dans des conditions *in vivo*, puisque les mutants K1 et O78 étaient sensibles aux premières étapes de la réponse immunitaire innée (effet bactéricide du sérum et des hétérophiles), les bactéries seraient éliminées avant d'atteindre les macrophages.

Les espèces bactériennes intracellulaires obligatoires et facultatives ont développé plusieurs mécanismes pour éviter de se retrouver dans des niches cellulaires hostiles à leur survie. La voie intracellulaire empreinte par la bactérie est définie par les facteurs bactériens mais également par l'état d'opsonisation de la bactérie (Agramonte-Hevia *et al.*, 2002). Dans cette étude, nous avons montré que l'opsonisation affectait différemment les bactéries dans leur persistance dans les macrophages. Nos résultats suggèrent que comme chez les phagocytes des mammifères, les macrophages des poulets possèdent une machinerie appropriée pour les différentes voies de la phagocytose. Les résultats inattendus étaient que certaines souches persistaient beaucoup plus longtemps dans les macrophages quand elles sont

opsonisées que quand elles ne le sont pas. Bien que la phagocytose non-opsonique soit considérée comme une arme de défense importante, elle est généralement moins efficace que la phagocytose opsonique (Ofek *et al.*, 1995). Nos résultats suggèrent que la phagocytose non-opsonique peut être dans certaines circonstances, plus efficace que la phagocytose opsonique chez le poulet. Le fait que la phagocytose non-opsonique soit plus efficace en absence de l'antigène O78 ou de la région 0-min pour la souche  $\chi$ 7122 ainsi que FimH et la capsule K1 pour la souche MT78 ou en présence de la souche TK3 indique que la nature de la structure moléculaire de la surface de la bactérie peut orienter la voie par laquelle la bactérie sera phagocytée.

Pour une compréhension plus poussée du processus pathogénique des APEC, il nous a semblé plus pertinent d'étudier la réponse de l'hôte à l'infection en mesurant la réponse biochimique des phagocytes de l'hôte dans les conditions opsonique et non-opsonique. Les macrophages sont les plus importantes cellules effectrices du système immunitaire, elles éliminent non seulement les micro-organismes mais elles déterminent aussi la nature des réactions immunitaires innées subséquentes. Les mécanismes microbicides des macrophages sont principalement oxygène-dépendant ou oxygène-indépendant qui sont souvent régulés par les cytokines.

Dans notre dernière partie d'étude, différents profils d'induction d'oxyde nitrique, de produits oxygénés et de cytokines ont été observés chez les phagocytes, dépendant de la souche infectante et de son état d'opsonisation. Le dosage colorimétrique de l'oxyde nitrique (NO) produit par les macrophages infectés avec

les différentes souches à une heure post-infection, a montré que comparativement aux souches APEC, la souche non-pathogène EC79 induisait des niveaux élevés de NO. Ce qui suggère que contrairement à une souche non-pathogène, les souches pathogènes aviaires ont bien la capacité de minimiser l'induction de NO chez les macrophages. L'utilisation des mutants des différents facteurs de virulence nous a permis de déterminer les facteurs impliqués dans ce processus. En absence de l'antigène O78, les bactéries de type rugueux induisaient des niveaux plus faibles en NO que leur souche mère de type lisse. Ce résultat n'est pas surprenant puisque le LPS des bactéries Gram-négatives est considéré comme un inducteur potentiel de l'oxyde nitrique synthétase (Marletta *et al.*, 1988; Stuehr and Marletta, 1985). Le phénomène inverse a été observé en absence de la capsule K1 de la souche MT78. La présence de la capsule K1 pourrait probablement masquer les structures de surface de la bactérie. Ces structures ne semblent pas être le fimbriae de type 1 puisque les mutants DM34 et PA68, qui sont dépourvus respectivement de Fim et FimH, induisaient le même niveau de NO que leur souche mère MT78 chez les macrophages. De façon similaire, Naslund *et al.* (1995) avaient démontré que les cellules capsulées de *Cryptococcus neoformans*, contrairement aux cellules non-capsulées n'induisaient pas l'oxyde nitrique synthétase des macrophages murins amorcés à l'IFN- $\gamma$ . D'après les auteurs, la présence de la capsule polysaccharidique masquerait le signal nécessaire à la sécrétion de TNF- $\alpha$  et par conséquent l'induction de l'oxyde nitrique synthétase.



Dans notre étude, le fimbriae P chez la souche TK3 ne semble pas activer le mécanisme d'induction de NO dans les macrophages, en effet, le même niveau de NO a été obtenu par les bactéries en présence ou en absence de PapG. Cependant la présence de la capsule K1 chez ces bactéries pourrait affecter l'interaction du fimbriae P avec les macrophages et par conséquent le rôle du fimbriae P pourrait être beaucoup plus apparent en absence de la capsule.

La production de dérivés oxygénés toxiques par les phagocytes a été détectée avec le NBT (nitrobleu de tétrazolium) dans les macrophages et par chémiluminescence au luminol et à la lucigénine dans le sang. Le NBT est un colorant pâle qui est capté par les phagocytes. En présence d'ions  $H^+$ , produits lors de l'oxydation de la NADPH, le NBT est réduit et forme un précipité violet à l'intérieur des phagocytes. L'intensité de la couleur obtenue est mesurée au spectrophotomètre. Nos résultats ont montré que malgré la forte association de la souche APEC MT78 aux cellules (Mellata *et al.*, 2003b), elle induisait une faible activité oxydative chez les macrophages. Ce résultat suggère la capacité de cette bactérie à inhiber l'activité oxydative des macrophages. Le mécanisme utilisé semble être lié à la présence du fimbriae de type 1, puisqu'en absence de Fim ou FimH, les bactéries induisaient des niveaux élevés de réponse oxydative, spécialement quand les bactéries étaient opsonisées. La nature du LPS semble également jouer un rôle important dans le mécanisme d'induction de la réponse oxydative, en effet, contrairement à O78, le LPS O26 des bactéries activait moins les phagocytes.

Lors de leur infection de l'hôte, les bactéries septicémiques traversent le flux sanguin pour atteindre les organes internes et autres sites du corps. Le sang aviaire possède plusieurs mécanismes pour lutter contre les bactéries invasives, incluant le complément et les phagocytes, spécialement les monocytes et les hétérophiles. L'habilité des souches APEC à résister au complément (Mellata *et al.*, 2000a) et aux hétérophiles (Mellata *et al.*, 2000b), ainsi que leur habilité à atteindre le sang et les organes internes des poulets infectés *in vivo* (Mellata *et al.*, 2000a) ont déjà été démontrés. Dans cette partie de notre projet, nous nous sommes intéressés à déterminer la réponse de l'hôte à l'infection en mesurant la réponse oxydative par chimiluminescence au lucigénine et au luminol des cellules du sang infectées avec les différentes souches.

Le luminol entre dans la cellule et réagit avec le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en présence de la myéloperoxydase, et mesure ainsi essentiellement la production intracellulaire des produits oxygénés (Allen, 1986). Comme la chimiluminescence au luminol détecte l'activité combinée peroxydase-oxydase impliquant la myéloperoxydase (Dahlgren and Stendahl, 1983), l'absence de réponse oxydative en présence de luminol dans notre étude pourrait être lié à l'absence de la myéloperoxydase dans les cellules de sang du poulet (Van Nerom *et al.*, 1997; 1998; Harmon, 1998).

La chimiluminescence à la lucigénine reflète également l'activité liée au complexe NADPH-oxydase (Steele, 1991), mais à cause du poids moléculaire élevé

de la lucigénine, elle ne peut pas entrer dans la cellule et par conséquent elle ne mesure que les dérivés oxygénés externes (Dahlgren and Briheim, 1985). Contrairement à la faible réponse oxydative obtenue chez les macrophages, la souche APEC MT78 induisait une réponse oxydative élevée chez les cellules du sang comparativement à celles induites avec les autres souches APEC et la souche non-pathogène. Cette différence dans les résultats serait liée à la différence dans la nature des cellules retrouvées dans le sang. La souche MT78 semble induire une activation élevée des cellules du sang en présence du fimbriae de type 1 et de la capsule K1. En effet, en absence de ces structures, les bactéries activaient moins les cellules du sang. La souche MT78 pourrait probablement se protéger des effets létaux des dérivés oxygénés des phagocytes soit en évitant l'expression dans le sang des facteurs inducteurs à savoir le fimbriae de type 1 et la capsule K1, ou bien en résistant aux produits oxygénés qu'elles ont induits grâce à la présence probable de certains facteurs comme une OMP (Stinavage *et al.*, 1990) ou le gène *recA* (Buchmeier *et al.*, 1993) déjà décrits chez *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium. Carlson et Carpenter (1980) ont rapporté que chez *E. coli*, le produit de *recA* est plus important que la catalase dans la défense contre les effets du peroxyde d'hydrogène.

La résistance de certaines bactéries intracellulaires à l'effet bactéricide des phagocytes est attribuée à leur capacité de réduire la réponse oxydative chez les phagocytes par la présence de certains LPS ou la libération de certains nucléotides qui compromettent la fonction des neutrophiles (Czuprynski, 1988). Nos résultats sur les APEC ont montré que O78 chez la souche  $\chi$ 7122 et à un faible degré PapG chez

la souche TK3 semblent réguler négativement l'activité oxydative. En leur absence, les souches mutantes activaient les cellules du sang à un degré plus élevé que leurs souches parentes respectives. La faible activation des cellules du sang par ces bactéries pourrait être liée à la faible interaction de ces bactéries avec les phagocytes (Mellata *et al.*, 2000b). De même, Tewari *et al.* (1994) avaient démontré que le fimbriae P induisait une faible activité oxydative des neutrophiles qui est liée à l'adhésine PapG.

L'activation des macrophages par des micro-organismes ou leurs dérivés induit la production de cytokines. La nature et la quantité des cytokines produites déterminent la physiopathologie de la maladie. Plusieurs études ont été réalisées sur la réponse cytokinaire chez les mammifères, alors que celles réalisées chez le poulet sont encore rares. Notre étude qui est, à notre connaissance, la première qui porte sur la réponse cytokinaire aux infections aux APEC chez le poulet a montré que les trois souches APEC et la souche non-pathogène testées induisaient différents profils de cytokines chez les macrophages.

Plusieurs agents infectieux résistent au système immunitaire de l'hôte en modulant sa réponse cytokinaire (Lunney, 1998). MacConnell *et al.* (1993) ont montré que le virus de l'anémie était capable d'inhiber la production des cytokines par les macrophages aviaires infectés. De même, nos résultats ont montré que la production de IL-1 $\beta$  n'était pas induite par les souches APEC  $\chi$ 7122, TK3 et MT78 non-opsonisées chez les macrophages. Ce résultat suggère que les souches APEC

sont capables de réguler négativement l'induction de IL-1 $\beta$ . *In vivo*, une telle régulation pourrait réduire la rapidité de la réponse inflammatoire dans les poumons et les sacs aériens et permettre ainsi aux bactéries d'entrer dans les cellules épithéliales et par la suite transloquer vers le flux sanguin. IL-1 $\beta$ , qui est une cytokine proinflammatoire avec des activités pleiotropiques, est rapidement induite chez les macrophages traités au LPS et atteint des niveaux maximaux en une heure post-traitement (Weining *et al.*, 1998). Le LPS bactérien semble engager des récepteurs spécifiques pour stimuler des voies de signalisation bien définies dans l'induction des cytokines (Kovacs *et al.*, 1988; Manthey *et al.*, 1993). Dans notre étude, au contraire, la présence de LPS chez la bactérie entière n'induisait pas automatiquement IL-1 $\beta$  dans les macrophages à une heure post-infection. Le fait que IL-1 $\beta$  était induit par la souche MT78 (O2) opsonisée mais pas par les autres souches APEC ou par  $\chi$ 7167 (O111),  $\chi$ 7168 (O26),  $\chi$ 7193 (O1) ou par  $\chi$ 7122 (O78) signifie que la nature du LPS et l'état d'opsonisation pourraient affecter l'induction de IL-1 $\beta$ . Nos résultats montrent également que le même sérotype n'induisait pas de la même façon IL-1 $\beta$ . En effet, IL-1 $\beta$  était induit par les bactéries opsonisées du mutant  $\chi$ 7193 (O1) de la souche  $\chi$ 7122 mais pas par celles de la souche APEC TK3 (O1). Par conséquent, d'autres facteurs bactériens pourraient interférer dans l'induction de IL-1 $\beta$  par le LPS.

À cause de l'absence des phagocytes résidants dans les voies respiratoires du poulet, la rapidité de l'attraction des phagocytes vers les poumons et les sacs aériens est une étape déterminante dans la lutte contre les infections respiratoires. IL-8 est

considérée comme une chimiokine pour les hétérophiles dans le site d'invasion de la bactérie (Kogut, 2002). Dans notre étude, à l'exception de la souche non-pathogène, toutes les souches testées induisaient la production d'IL-8 dans les macrophages. Nous avons déjà démontré que les souches APEC étaient capables de résister plus efficacement aux hétérophiles que la souche non-pathogène et que le fimbriae de type 1 et la capsule K1, l'antigène O78 et PapG semblent protéger les bactéries de l'effet bactéricide des phagocytes, spécialement des hétérophiles (Mellata *et al.*, 2003b). Donc, l'attraction des hétérophiles par IL-8 au site d'infection ne pourra pas affecter la propagation des souches APEC. Nos résultats indiquent que les facteurs de virulence testés ne sont pas impliqués dans l'induction de IL-8, mais plutôt dans les autres mécanismes de résistance aux phagocytes.

MIP-1 $\beta$  appartient à la famille des chimiokines C-C produites par les monocytes. La souche non-pathogène EC79 induisait seulement MIP-1 $\beta$  parmi les cytokines recherchées. MIP-1 $\beta$  produite par le macrophage infectée pourrait jouer un rôle dans le recrutement et l'accumulation des hétérophiles et des lymphocytes dans le site d'infection microbienne, tel qu'observé lors de l'infection mycoplasmique (Lam, 2002). Nos résultats montrent que certaines structures de surface jouent un rôle dans la modulation de l'induction de MIP-1 $\beta$ . En effet, Fim chez MT78 et PapG chez TK3 semblaient induire MIP-1 $\beta$  dans les macrophages, puisqu'en leur absence cette cytokine n'est pas induite. À notre connaissance c'est la première fois que les fimbriae de type 1 et P ont été impliqués dans l'induction de la cytokine MIP-1 $\beta$ .

La phagocytose non-opsonique pouvait être, dans certaines circonstances, plus efficace que la phagocytose opsonique chez les poulets (Mellata *et al.*, 200b). Les résultats des différents tests utilisés dans cette dernière partie de notre étude pour mesurer l'activité des macrophages ont montré que les phagocytes étaient en effet plus activés par les bactéries non-opsonisées qu'avec les bactéries opsonisées. La voie intracellulaire utilisée par les bactéries pour s'associer aux phagocytes pourrait activer différemment les voies de signalisation des cellules et pourrait influencer le degré d'exposition du pathogène aux mécanismes microbicides. D'autres investigations sur le mécanisme d'activation des phagocytes aviaires sont requises pour mieux comprendre ce phénomène.

Nos résultats ont démontré que le système immunitaire répond différemment aux différentes souches testées. Les souches APEC testées semblent résister aux phagocytes en modulant les réponses de l'hôte par des mécanismes différents. Les facteurs de virulence impliqués dans ce processus sont l'antigène O78 chez  $\chi$ 7122, la capsule K1 chez MT78 et PapG chez TK3. L'importance de la réponse immunitaire innée réside non seulement dans son rôle de première défense qui consiste à limiter l'infection jusqu'à ce que la réponse acquise soit initiée mais elle fournit également des instructions requises pour les réponses immunitaires acquises. L'élucidation des différents profils de la réponse immunitaire aux infections aux APEC pourrait être importante dans le contrôle de la maladie. Les médiateurs du système immunitaire pourraient être des cibles intéressantes pour les vaccins et les interventions thérapeutiques pour le contrôle de la colibacillose chez le poulet.



## **V. CONCLUSION**



Les trois souches APEC MT78 (O2 :K1), TK3 (O1 :K1) et  $\chi$ 7122 (O78 :K80) étaient capables de reproduire les signes cliniques de la colibacillose dans nos conditions expérimentales d'*in vivo* chez les poulets. Les différentes souches utilisent des mécanismes différents pour se disséminer dans l'hôte. L'utilisation des souches mutantes nous a permis de démontrer que le sérotype O78 et la région 0-min de la souche  $\chi$ 7122, et la capsule K1 de la souche MT78, sont impliqués dans le processus pathogénique de ces bactéries. En leur absence, les bactéries sont incapables de coloniser les fluides corporels et les organes internes.

Nos résultats montrent une corrélation entre la résistance au sérum et le pouvoir septicémique des souches APEC, en effet toutes les souches rendues sensibles au sérum sont incapables d'infecter les organes internes. La résistance au sérum est l'un des mécanismes utilisés par ces bactéries pour se disséminer dans l'organisme et atteindre les organes internes des poulets. Cependant, du fait que la souche mutante TK37G (*papG*) qui est résistante au sérum, induise moins de lésions sévères des aérosacculite et périhépatite que la souche mère TK3 chez des poulets infectés suggère que l'adhésine PapG est impliquée dans un autre mécanisme du processus pathogénique de la souche.

Les souches APEC résistent beaucoup plus à l'effet bactéricide des phagocytes que la souche non pathogène. Nos résultats montrent que les différents facteurs de virulence associés aux souches APEC déterminent le comportement de ces souches au contact des phagocytes. Le fimbriae de type 1 chez la souche MT78 permet aux

bactéries de s'associer aux phagocytes, par contre la capsule K1 chez la souche MT78, l'antigène O78 et la région 0-min chez la souche  $\chi$ 7122 et le fimbriae P chez la souche TK3 avaient un effet contraire. Ces résultats suggèrent que différents mécanismes sont utilisés par les souches APEC lors de leur interaction avec les phagocytes.

Nous avons également démontré l'importance de certains facteurs de virulence (Fim et K1 chez la souche MT78, l'antigène O78 et la région 0-min chez la souche  $\chi$ 7122 et le fimbriae P chez la souche TK3) dans la résistance à l'effet bactéricide des phagocytes, et particulièrement des hétérophiles. Ces résultats sont particulièrement intéressants puisque que les hétérophiles forment la première ligne de défense cellulaire contre les pathogènes invasifs dans les poumons et les sacs aériens, là où les macrophages résidants sont absents. L'activité des hétérophiles pourrait réduire la multiplication bactérienne à un niveau permettant une élimination bactérienne plus efficace par les défenses subséquentes de l'hôte. En présence des facteurs Fim, la capsule K1, l'antigène O78, la région 0-min ou le fimbriae P, les bactéries pourraient faire face de façon plus efficace à l'activité bactéricide des hétérophiles et par la suite envahir l'hôte. Les facteurs de virulence testés dans cette étude ne semblent par être impliqués dans la persistance des souches APEC dans les macrophages. Cependant, les mutants O78 et K1 pourraient être éliminés par le sérum et les hétérophiles avant d'atteindre les macrophages.

La résistance des souches aux macrophages et aux hétérophiles, testée dans les conditions opsonique et non-opsonique, nous a permis de démontrer que : (1) le fimbriae de type 1 permet aux bactéries d'adhérer aux phagocytes en absence de l'opsonine, (2) en présence de certains facteurs tels que le LPS O78 et la capsule K1, certaines bactéries sont capables de résister à l'opsonisation, (3) dans certaines conditions, la phagocytose non-opsonique pouvait être plus efficace que la phagocytose opsonique. En absence de l'opsonine, certaines structures de surface de la bactérie, telles que le LPS O78, l'adhésine FimH et la capsule K1, pourraient utiliser certains récepteurs spécifiques des macrophages pour orienter les bactéries vers un trafic intracellulaire plus sécuritaire.

Les résultats des tests sur la réponse nitrique, oxydative et cytokinaire des macrophages infectés par les différentes souches, montrent que les souches APEC contrecarrent le système immunitaire par des voies distinctes. Les souches testées induisent différemment l'oxyde nitrique dans les macrophages; contrairement aux souches APEC, la souche non-pathogène induit le niveau le plus élevé de NO. Nous avons démontré que la capsule K1 est l'un des facteurs qui permettait aux souches APEC de diminuer la réponse nitrique des macrophages, probablement en masquant certaines structures de surface activatrices, tels que les LPS.

La souche MT78 se distingue des autres souches APEC testées et de la souche non-pathogène par son profil d'induction de la réponse oxydative dans les phagocytes. En effet, elle induit une faible activité oxydative dans les macrophages et

au contraire une activité élevée dans le sang. Le fimbriae de type 1 module différemment la réponse des macrophages et des cellules du sang. En sa présence, la réponse oxydative induite est faible dans les macrophages mais au contraire élevée dans le sang. La présence de O78 chez la souche  $\chi$ 7122 et PapG chez la souche TK3 inhibent l'activité oxydative des cellules du sang. Par contre, la capsule K1 chez la souche MT78 active les cellules du sang.

Notre étude, qui est à notre connaissance, la première qui porte sur la réponse cytokinaire aux infections aux APEC chez le poulet, a montré que : (1) les différentes souches testées induisent des profils de cytokines différents, (2) les souches APEC sont capables de moduler l'expression de certaines cytokines, telle que l'IL-1 $\beta$  et que l'état d'opsonisation et la nature du LPS des bactéries affectent l'expression des cytokines et enfin (3) les fimbriae de type 1 et P sont impliqués dans l'induction de la chimiokine MIP-1 $\beta$ .

La capacité des souches pathogènes à inhiber la production de certaines cytokines, essentiellement IL-1, par des mécanismes qui leur est propre durant l'infection, pourrait être un mécanisme important utilisé par les bactéries pathogènes dans leurs processus pathogéniques.

Nos résultats sur la phagocytose avaient suggéré que la phagocytose non-opsonique pouvait être dans certaines circonstances plus efficace que la phagocytose opsonique, chez les poulets. La mesure de la réponse biochimique des phagocytes a

montré que les phagocytes étaient en effet plus activés par les bactéries non-opsonisées que par les bactéries opsonisées. Les souches testées pourraient utiliser des récepteurs différents des macrophages et ainsi activer ou altérer différentes voies de signalisation des macrophages. La voie intracellulaire utilisée par les bactéries pour coloniser les phagocytes pourrait activer différemment les cellules et ainsi influencer le degré de l'exposition des bactéries aux mécanismes microbicides. D'autres investigations sur le mécanisme d'activation des phagocytes aviaires sont requises pour mieux comprendre ce phénomène.

Les différents résultats obtenus pourraient aider à la mise au point des approches plus efficaces pour lutter contre les infections aux APEC en prenant en considération les différents profils obtenus avec les différentes souches. Les médiateurs du système immunitaire pourraient être considérés comme des cibles intéressantes pour les vaccins et les interventions thérapeutiques pour le contrôle de la colibacillose chez le poulet.



## **VI. BIBLIOGRAPHIE**

**Abraham, J. M., C. S. Freitag, J. R. Clements, et B. I. Eisenstein** 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **82**(17): 5724-5727.

**Achtman, M., P. A. Manning, B. Kusecek, S. Schwuchow, et N. Willetts** 1980. A genetic analysis of F sex factor cistrons needed for surface exclusion in *Escherichia coli*. J Mol Biol **138**(4): 779-795.

**Achtman, M., M. Heuzenroeder, B. Kusecek, H. Ochman, D. Caugant, R. K. Selander, V. Vaisanen-Rhen, T. K. Korhonen, S. Stuart, F. Ørskov, et I. Ørskov** 1986. Clonal analysis of *Escherichia coli* O2:K1 isolated from diseased humans and animals. Infect Immun **51**(1): 268-276.

**Ackermann, M. R., et N. F. Cheville** 1991. Ultrastructural studies of the lung of turkeys (*Meleagris gallopavo*) inoculated intratracheally with *Escherichia coli*. Vet PATHOL **28**: 183-191.

**Agramonte-Hevia J., A. González-Arenas, D. Barrera, et M. Velasco-Velázquez.** 2002. Gram-negative bacteria and phagocytic cell interaction mediated by complement receptor 3. FEMS Immunol. and med. Microbiol. **34**: 255-266.

**Allan, B. J., J. V. Van den Hurk, et A.A. Potter** 1993. Characterization of *Escherichia coli* isolated from cases of avian colibacillosis. Can J Vet Res **57**(3): 146-151.

**Allen, R. C.** 1986. Phagocytic leukocyte oxygenation activities and chemiluminescence: a kinetic approach to analysis. *Methods Enzymol* **133**: 449-493.

**Andreasen, C. B., K. S. Latimer, B. G. Harmon, J. R. Glisson, J. M. Golden, et J. Brown** 1991. Heterophil function in healthy chickens and in chickens with experimentally induced staphylococcal tenosynovitis. *Vet Pathol* **28**(5): 419-427.

**Andreasen, J. R., Jr., C. B. Andreasen, M. Anwer, et A. E. Sonn** 1993. Chicken heterophil chemotaxis using *Staphylococcus*-generated chemoattractants. *Avian Dis* **37**(3): 835-838.

**Arné, P., D. Marc, A. Brée, C. Schouler, et M. Dho-Moulin** 2000. Increased tracheal colonization in chickens without impairing pathogenic properties of avian pathogenic *Escherichia coli* MT78 with a *fimH* deletion. *Avian Dis* **44**(2): 343-355.

**Arp, L. H., et A. E. Jensen** 1979. Pilation, hemagglutination, motility and generation time of *Escherichia coli* in turkeys. *Avian Dis*(24): 153-161.

**Austin, J. W., G. Sanders, W. W. Ka, et S. K. Collinson.** 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **162**(2): 295-301.

**Awadhiya, R. P., J. L. Vegad, et G. N. Kolte** 1980. Demonstration of the phagocytic activity of chicken thrombocytes using colloidal carbon. *Res Vet Sci* **29**(1): 120-122.

**Bahrani-Mougeot F., NW. Gunther IV, MS. Donnenberg et HLT. Mobley.** 2002. Uropathogenic *Escherichia coli*. Pp. 239-268. In MS. Donnenberg (Ed.). *Escherichia*



*coli*, virulence mechanisms and a versatile pathogen. Academic Press, California (USA).

**Barnes, H. J., et W. B. Gross** 1997. Colibacillosis. *In*. B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, L. R. McDougald and Y. M. Saif. (eds.). Diseases of poultry. Pp.131-141. Iowa State University Press Ames, Iowa, USA.

**Barnes, H. J., J. P. Vaillancourt, et W. B. Gross.** 2003. Colibacillosis. *In*. Y. M. Saif, H. J. Barnes, J. R. Glisson, A. M. Fadly, L. R. McDougald, et D. E. Swayne (eds.). Diseases of poultry. 11<sup>th</sup> Edition. Pp 631-652. Iowa State Press (USA).

**Barondess, J. J., et J. Beckwith** 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature* **346**(6287): 871-874.

**Benz, I., et M. A. Schmidt** 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**(11): 1539-1546.

**Beutin, L.** 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res* **30**(2-3): 285-98.

**Bian, Z., A. Brauner, Y. Li, et S. Normark** 2000. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J Infect Dis* **181**(2): 602-612.

**Bilge, S. S., C. R. Clausen, W. Lau, et S. L. Moseley** 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *J Bacteriol* **171**(8): 4281-4289.

- Binns, M. M., D. L. Davies, et K. G. Hardy** 1979. Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* **279** (5716): 778-781.
- Binns, M. M., J. Mayden, et R. P. Levine** 1982. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV,I-K94. *Infect Immun* **35**(2): 654-659.
- Björkstén, B., et T. Wadström** 1982. Interaction of *Escherichia coli* with different fimbriae and polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **38**(1): 298-305.
- Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, et J. Blanco** 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol* **35**(11): 2953-2957.
- Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, W. H. Jansen, V. Garcia, M. L. Vazquez, et J. Blanco** 1998. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). *Vet Microbiol* **61**(3): 229-235.
- Bloch, C. A., B. A. Stocker, et P. E. Orndorff** 1992. A key role for type 1 pili in enterobacterial communicability. *Mol Microbiol* **6**(6): 697-701.
- Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschape, et J. Hacker** 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* **62**(2): 606-614.

**Blum G., V. Falbo, A. Caprioli, et J. Hacker** 1995. Gene clusters encoding the cytotoxic necrotizing factor type 1, Prs-fimbriae and alpha-hemolysin form the pathogenicity island II of the uropathogenic *Escherichia coli* strain J96. FEMS Microbiol Lett **126**(2): 189-195.

**Brée, A., M. Dho, et J. P. Lafont** 1989. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. Avian Dis **33**(1): 134-139.

**Brooks, R. L., D. I. Bounous, et C. B. Andreasen** 1996. Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. Comp Haematol Int **53**(6): 153-159.

**Brown, P. K., et R. Curtiss III** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc Natl Acad Sci U S A **93**(20): 11149-11154.

**Brown, P. K., C. M. Dozois, C. A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge, et R. Curtiss III** 2001. MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Mol Microbiol **41**(2): 349-363.

**Buchmeier, N. A., C. J. Lipps, M. Y. So, et F. Heffron** 1993. Recombination-deficient mutants of *Salmonella typhimurium* are avirulent and sensitive to the oxidative burst of macrophages. Mol Microbiol **7**(6): 933-936.

**Burns, S. M., et S. I. Hull** 1999. Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O(-) and K(-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 strain. *Infect Immun* **67**(8): 3757-3762.

**Carlson, H. C., et J. R. Allen** 1969. The acute inflammatory reaction in chicken skin: blood cellular response. *Avian Dis* **13**(4): 817-833.

**Carlsson, J., et V. S. Carpenter** 1980. The *recA*<sup>+</sup> gene product is more important than catalase and superoxide dismutase in protecting *Escherichia coli* against hydrogen peroxide toxicity. *J Bacteriol* **142**(1): 319-321.

**Cellier, M., A. Belouchi, et P. Gros** 1996. Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp. *Trends Genet* **12**(6): 201-204.

**Chanh, T. C., A. A. Benedict, et H. Abplanalp** 1976. Association of serum hemolytic complement levels with the major histocompatibility complex in chickens. *J Exp Med* **144**(2): 555-561.

**Chanteloup, N. K., M. Dho-Moulin, E. Esnault, A. Brée, et J. P. Lafont** 1991. Serological conservation and location of the adhesin of avian *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Microb Pathog* **10**(4): 271-280.

**Chapman, M. R., L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, et S. J. Hultgren** 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**(5556): 851-855.

**Cheville, N. F., et L. H. Arp** 1978. Comparative pathologic findings of *Escherichia coli* infection in birds. J. Am. Vet. Med. Assoc. **173**: 584-587.

**Chuba, P., S. Palchaudhuri, et M. Leon** 1986. Contributions of *TraT* and *iss* genes to the serum resistance phenotype of plasmid ColV2-K94. FEMS Microbiol Lett **37**: 135-140.

**Chuba, P. J., M. A. Leon, A. Banerjee, et S. Palchaudhuri** 1989. Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. Mol Gen Genet **216**(2-3): 287-292.

**Cloud, S. S., J. K. Rosenberger, P. A. Fries, R. A. Wilson, et E. M. Odor** 1985. In vitro and in vivo characterization of avian *Escherichia coli*. I. Serotypes, metabolic activity, and antibiotic sensitivity. Avian Dis **29**(4): 1084-1093.

**Collins, T.** 1999. Acute and chronic inflammation. Pp. 50- 88. *In Robbins Pathologic basis of disease*. 3<sup>ed</sup> edition. R. S. Cotran, V. Kumar and T. Collins (eds.). Philadelphia, Pennsylvania, W.B. Saunders Company.

**Collinson, S. K., L. Emody, K. H. Muller, T. J. Trust, et W. W. Kay** 1991. Purification and characterization of thin, aggregative fimbriae from *Salmonella enteritidis*. J Bacteriol **173**(15): 4773-4781.

**Collinson, S. K., S. C. Clouthier, J. L. Doran, P. A. Banser, et W. W. Kay** 1996. *Salmonella enteritidis* agfBAC operon encoding thin, aggregative fimbriae. J Bacteriol **178**(3): 662-667.

- Crippen, T. L., C. L. Sheffield, H. He, V. K. Lowry, et M. H. Kogut** 2003. Differential nitric oxide production by chicken immune cells. *Dev Comp Immunol* **27**(6-7): 603-610.
- Cross, A. S.** 1990. The biologic significance of bacterial encapsulation. *Curr Top Microbiol Immunol* **150**: 87-95.
- Cross, A. S., P. Gemski, J. C. Sadoff, F. Ørskov et I. Ørskov** 1984. The importance of the K1 capsule in invasive infections caused by *Escherichia coli*. *J. Infect.. Dis.* **149** (2): 184-193.
- Czuprynski, C. J.** 1988. Bacterial evasion of cellular defense mechanisms: an overview. Pp. 141-160. *In*. J. M. Roth (ed.). *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM, Washington (USA).
- Dahlgren, C., et O. Stendahl** 1983. Role of myeloperoxidase in luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **39**(2): 736-741.
- Dahlgren, C., et G. Briheim** 1985. Comparison between the luminol-dependent chemiluminescence of polymorphonuclear leukocytes and of the myeloperoxidase-HOOH system: influence of pH, cations and protein. *Photochem Photobiol* **41**(5): 605-610.
- De Lorenzo, V., A. Bindereif, B. H. Paw, et J. B. Neilands** 1986. Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **165**(2): 570-878.

**Delicato, E. R., B. G. de Brito, L. C. Gaziri, M. C. Vidotto.** 2003 Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Vet Microbiol.* **94(2):**97-103.

**Dho, M., et J. P. Lafont** 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis* **28(4):** 1016-1025.

**Dho-Moulin, M., J. F. Van den Bosch, J. P. Girardeau, A. Brée, T. Barat, et J. P. Lafont** 1990. Surface antigens from *Escherichia coli* O2 and O78 strains of avian origin. *Infect Immun* **58(3):** 740-745.

**Dho-Moulin, M.** 1993. Les *Escherichia coli* pathogènes des volailles. *Ann. Méd. Vét.* **137:** 353-357.

**Dho-Moulin, M., A. Brée, C. Desautels, et J.M. Fairbrother** 1997. Relationship between presence of the *tsh* and *csga* genes and virulence in avian *Escherichia coli*. 4-8 May Miami beach, FL, American Society for Microbiology.

**Dho-Moulin, M., et J. M. Fairbrother** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30(2-3):** 299-316.

**Dias da Silveira, W., A. Ferreira, M. Brocchi, L. Maria de Hollanda, A. F. Pestana de Castro, A. Tatsumi Yamada, et M. Lancellotti** 2002. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* **85(1):** 47-53.

- Dietert, R. R., K. A. Golemboski, S. E. Bloom, et M. A. Qureshi** 1991. The avian macrophages in cellular immunity. Avian cellular Immunity. J. M. Sharma. Boca Raton, FL, CRC Press: 71-95.
- Dietert, R. R., et K. A. Golemboski** 1998. Avian macrophage metabolism. *Poult Sci* 77(7): 990-997.
- Dil N. et MA. Qureshi.** 2002 Involvement of lipopolysaccharide related receptors and nuclear factor  $\kappa$ B in differential expression of inducible nitric oxide synthase in chicken macrophages from different genetic backgrounds. *Vet Immunol Immunopathol.* 88:149–161.
- Donnenberg, M. S., et J. B. Kaper** 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* 59(12): 4310-4317.
- Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, et M. Bosse** 1992. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* 60(7): 2648-2656.
- Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, et J. M. Fairbrother** 1994. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* 38(2): 231-239.



**Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh, et J. M. Fairbrother** 1995. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol* **45**(4): 297-309.

**Dozois, C. M., J. Harel, et J. M. Fairbrother** 1996. P-fimbriae-producing septicaemic *Escherichia coli* from poultry possess *fel*-related gene clusters whereas *pap*-hybridizing P-fimbriae-negative strains have partial or divergent P fimbrial gene clusters. *Microbiology* **142**(10): 2759-2766.

**Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels, et R. Curtiss III** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**(7): 4145-4154.

**Duguid, J. P., et D. C. Old** 1980. Adhesive properties of enterobacteriaceae. Bacterial adherence. Receptors and recognition series. E. H. Beachey. London, Chapman and Hall. **6**: 185-217.

**Duncan, R. L. Jr., et W. P. McArthur** 1978. Partial characterization and the distribution of chicken mononuclear cells bearing the Fc receptor. *J Immunol* **120**(3): 1014-1020.

**Egami, M. I., et W. S. Sasso** 1991. Topochemistry of blood cells of the *Gallus domesticus* (Aves, Galliforme). *Rev Bras Biol* **51**(1): 211-4.

**Elfadil, A. A., J. P. Vaillancourt, A. H. Meek, R. J. Julian, et C. L. Gyles** 1996. Description of cellulitis lesions and associations between cellulitis and other categories of condemnation. *Avian Dis* **40**(3): 690-698.

**Ellis M. G., L. H. Arp, et S. J. Lamont** 1988. Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am J Vet Res* **49**(12): 2034-2037.

**Emery, D. A., K. V. Nagaraja, D. P. Shaw, J. A. Newman, et D. G. White** 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis* **36**(3): 504-511.

**Evans E. W., F. G. Beach, K. M. Moore, M. W. Jackwood, J. R. Glisson, et B. G. Harmon** 1995. Antimicrobial activity of chicken and turkey heterophil peptides CHP1, CHP2, THP1, and THP3. *Vet Microbiol* **47**(3-4): 295-303.

**Fairbrother, J. M., A. Broes, M. Jacques, et S. Larivière** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am J Vet Res* **50**(7): 1029-1036.

**Fairbrother, J. M.** 1993. Les colibacilloses du porc. *Ann. Méd. Vét.* **137**: 369-375.

**Fairbrother, J. M., R. Higgins, et C. Desautels** 2000. Trends in pathotypes and antimicrobial resistance of *Escherichia coli* isolates from piglets with postweaning diarrhea in Quebec. 16th International Pig veterinary Society Congress, Melbourne, Australia, 17-20 September 2000.

**Fantinatti, F., W. D. Silveira, et A. F. Castro** 1994. Characteristics associated with pathogenicity of avian septicaemic *Escherichia coli* strains. *Vet Microbiol* **41**(1-2): 75-86.

**Farnell, MB, TL. Crippen, H. He, CL. Swaggerty, et MH. Kogut.** 2003a. Oxidative burst mediated by Toll-like receptors (TLR) and CD14 on avian heterophils stimulated with bacterial Toll agonists. *Dev Comp Immunol* **27** : 423–429.

**Farnell MB, H. He, et MH. Kogut.** 2003. Differential activation of signal transduction pathways mediating oxidative burst by chicken heterophils in response to stimulation with lipopolysaccharide and lipoteichoic acid. *Inflammation* **25**:225–232.

**Fedde, M. R.** 1998. Relationship of structure and function of the avian respiratory system to disease susceptibility. *Poult Sci* **77**(8): 1130-1138.

**Ficken, M. D., J. F. Edwards, et J. C. Lay** 1986. Induction, collection, and partial characterization of induced respiratory macrophages of the turkey. *Avian Dis* **30**(4): 766-771.

**Ficken, M. D., et H. J. Barnes** 1989. Acute airsacculitis in turkeys inoculated with *Pasteurella multocida*. *Vet Pathol* **26**(3): 231-237.

**Foster, G., H. M. Ross, T. W. Pennycott, G. F. Hopkins, et I. M. McLaren** 1998. Isolation of *Escherichia coli* O86:K61 producing cyto-lethal distending toxin from wild birds of the finch family. *Lett Appl Microbiol* **26**(6): 395-398.

**Fukui, A., N. Inoue, M. Matsumoto, M. Nomura, K. Yamada, Y. Matsuda, K. Toyoshima, et T. Seya.** 2001. Molecular cloning and functional characterization of chicken toll-like receptors: a single chicken toll covers multiple molecular patterns. *J. Biol. Chem.* **276**:47143–47149.

**Frédette, M. A., et M. Boulianne** 1994. Processus inflammatoire: pathologie comparée et intervention clinique chez les oiseaux. *MV Québec* **24 (4)**: 172-174.

**Garcia, E., H. E. Bergmans, J. F. Van den Bosch, I. Ørskov, B. A. Van der Zeijst et W. Gaastra** 1988. Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Escherichia coli* strains and their fimbriae. *Antonie Van Leeuwenhoek* **54(2)**: 149-163.

**Golemboski, K. A., S. E. Bloom, et R. R. Dietert** 1990. Dynamics of avian inflammatory response to cross-linked dextran. Changes in avian blood leukocyte populations. *Inflammation* **14(1)**: 31-40.

**Green, L. C., D. A. Wagner, J. Glogowski, P. L. Skipper, J. S. Wishnok, et S. R. Tannenbaum** 1982. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* **126(1)**: 131-138.

**Griffiths, E.** 1994. Iron acquisition system, pp. 533-566 *In* C. L. Gyles (ed.) *Escherichia coli. Escherichia coli* in domestic animals and humans. Guildford, UK, CAB International:

**Groisman, E. A., et H. Ochman** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87(5)**: 791-794.

**Gross, W. B.** 1994. Diseases due to *Escherichia coli* in poultry, pp.237-259. In C. L. Gyles (ed.) *Escherichia coli* in domestic animals and Man. Wallingford, UK., CAB International.

**Gunshin, H., B. Mackenzie, UV Berger, Y. Gunshin, MF. Romero, WF. Boron, S. Nussberger, JL. Gollan, et M. A. Hediger.** 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature*. **388** (6641) :482-488.

**Gunter, N. W., V. Lockett, D. E. Johnson, et H. L. Mobley.** 2001. *In vivo* dynamics of type 1 fimbriae regulation in uropathogenic *Escherichia coli* during experimental urinary tract infection. *Infect. Immun.* **69** : 2838-2848.

**Gupta, D. S., A. S. Shashkov, B. Jann, et K. Jann.** 1992. Structures of the O1B and O1C lipopolysaccharide antigens of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**:7963-70.

**Gupta, R. K., W. Egan, D. A. Bryla, J. B. Robbins, et S. C. Szu.** 1995. Comparative immunogenicity of conjugates composed of *Escherichia coli* O111 O-specific polysaccharide, prepared by treatment with acetic acid or hydrazine, bound to tetanus toxoid by two synthetic schemes. *Infect Immun* **63**:2805-10.

**Gyimah, J. E., et B. Panigrahy** 1988. Adhesin-receptor interactions mediating the attachment of pathogenic *Escherichia coli* to chicken tracheal epithelium. *Avian Dis* **32**(1): 74-78.

**Gyles, C. L.** 1994. *Escherichia coli* enterotoxins. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles (Ed.). Wallingford, Cab International: 337-364.

**Hacker, J.** 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. *Can J Microbiol* **38**(7): 720-727.

**Hala K., C. Moore, J. Plachy, B. Kaspers, G. Böck et A. Hofmann.** 1998. Genes of chicken MHC regulate the adherence activity of blood monocytes in Rous sarcomas progressing and regressing lines. *Vet. Immunol and Immunopathology* **66** 143-157.

**Han, P. F., et J. R. Smyth, Jr.** 1972. The influence of growth rate on the development of Marek's disease in chickens. *Poult Sci* **51**(3): 975-85.

**Hammar, M., A. Arnqvist, et S. Normark** 1995. Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**(4): 661-670.

**Hammar, M., Z. Bian, A. Olsen, et S. Normark** 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(13): 6562-6.

**Harel, J., J. Fairbrother, C. Forget, C. Desautels, et J. Moore** 1993. Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet Microbiol* **38**(1-2): 139-55.

**Harmon, B. G., J. R. Glisson, et J. C. Nunnally** 1992. Turkey macrophage and heterophil bactericidal activity against *Pasteurella multocida*. *Avian Dis* **36**(4): 986-91.

**Harmon, B. G.** 1998. Avian heterophils in inflammation and disease resistance. *Poult Sci* 77(7): 972-977.

**Herwald, H., M. Morgelin, A. Olsen, M. Rhen, B. Dahlback, W. Muller-Esterl, et L. Bjorck** 1998. Activation of the contact-phase system on bacterial surfaces--a clue to serious complications in infectious diseases. *Nat Med* 4(3): 298-302.

**Hilton, L. S., A. G. Bean, et J. W. Lowenthal** 2002. The emerging role of avian cytokines as immunotherapeutics and vaccine adjuvants. *Vet Immunol Immunopathol* 85(3-4): 119-128.

**Horne, S. M., S. J. Pfaff-McDonough, C. W. Giddings, et L. K. Nolan** 2000. Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* 44(1): 179-184.

**Horwitz, M. A., et S. C. Silverstein** 1980. Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes. *J Clin Invest* 65(1): 82-94.

**Howard, C. J., et A. A. Glynn** 1971. The virulence for mice of strains of *Escherichia coli* related to the effects of K antigens on their resistance to phagocytosis and killing by complement. *Immunology* 20(5): 767-77.

**Hu J., Bumstead N., Burke D., F. A. Ponce de Leon, E. Skamene, P. Gros, et D. Malo** 1995. Genetic and physical mapping of the natural resistance-associated macrophage protein 1 (NRAMP1) in chicken. *Mamm Genome* 6(11): 809-815.

**Hu J., N. Bumstead, P. Barrow, G. Sebastiani, L. Olien, K. Morgan, et D. Malo** 1997. Resistance to salmonellosis in the chicken is linked to NRAMP1 and TNC. *Genome Res* 7(7): 693-704.

**Hull, R. A., R. E. Gill, Minshew BH, et S. Falkow** 1981. Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect Immun* 33(3): 933-8.

**Hultgren S. J., T. N. Porter, A. J. Schaeffer, et J. L. Duncan** 1985. Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun* 50(2): 370-377.

**Hussain, I., et M. A. Qureshi** 1997. Nitric oxide synthase activity and mRNA expression in chicken macrophages. *Poult Sci* 76(11): 1524-1530.

**Hussain, I., et M. A. Qureshi** 1998. The expression and regulation of inducible nitric oxide synthase gene differ in macrophages from chickens of different genetic background. *Vet Immunol Immunopathol* 61(2-4): 317-329.

**Hynes, R. O.** 1987. Integrins: a family of cell surface receptors. *Cell* 48(4): 549-554.

**Ike, K., K. Kume, K. Kawahara, et H. Danbara** 1990. Serotyping of O and pilus antigens of *Escherichia coli* strains isolated from chickens with coli-septicemia. *Nippon Juigaku Zasshi* 52(5): 1023-1027.



**Ike, K., K. Kawahara, H. Danbara, et K. Kume** 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J Vet Med Sci* **54**(6): 1091-1098.

**Inoue, T., T. Tsuji, M. Koto, S. Imamura, et A. Miyama** 1993. Amino acid sequence of heat-labile enterotoxin from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to that of human strain H 10407. *FEMS Microbiol Lett* **108**(2): 157-161.

**Jansson, P. E., B. Lindberg, G. Widmalm, et K. Leontein.** 1987. Structural studies of the *Escherichia coli* O78 O-antigen polysaccharide. *Carbohydr Res* **165**:87-92.

**Janssens S. et R. Beyaert.** 2003. Role of Toll-Like Receptors in Pathogen Recognition. *Clin. Microbio. Reviews* **16** (4): 637-646

**Johansson, C., T. Nilsson, A. Olsen, et M. J. Wick** 2001. The influence of curli, a MHC-I-binding bacterial surface structure, on macrophage-T cell interactions. *FEMS Immunol Med Microbiol* **30**(1): 21-29.

**Johnson, J. R.** 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**(1): 80-128.

**Johnson, J. R.** 1997. Urinary tract infection. *Escherichia coli*, mechanisms of virulence. M. Sussman, Cambridge University Press: 495-549.

**Johnson, J. R., et T. A. Russo** 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". *J Lab Clin Med* **139**(3): 155-162.

**Joya, J. E., T. Tsuji, A. V. Jacalne, M. Arita, T. Tsukamoto, T. Honda, et T. Miwatani** 1990. Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks. *Eur J Epidemiol* **6**(1): 88-90.

**Kaeckenbeeck, A.** 1993. Le diagnostic des souches pathogènes d'*Escherichia coli*: petites et grandes histoires. *Ann. Méd. Vét.* **137**: 337-340.

**Kagan, B. L., M. E. Selsted, T. Ganz, et R. I. Lehrer** 1990. Antimicrobial defensin peptides form voltage-dependent ion-permeable channels in planar lipid bilayer membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(1): 210-214.

**Kaiser P., N. Bumstead, M. Goodchild, D. Atkinson et L. Rothwell.** 2001. Characterizing chicken cytokines genes IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-15 and IL-18. Current Progress on avian immunology research. K. A. Schat (Ed.). Proceedings of 6<sup>th</sup> Avian Immunology Research Group Meeting, Cornell University (NY), October 8-10, 2000. pp. 27-32.

**Kaspars, B., A. Hoffman, M. Buttner, et U. Losch** 1995. Interferon-induced nitric oxide synthesis in avian macrophages. *Advances in avian immunology research*. T. F. Davidson, N. Bumstead and P. Kaiser. Abington, UK, Carfax Publishing: 161-168.

**Katwa, L. C., et A. A. White** 1992. Presence of functional receptors for the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin in the gastrointestinal tract of the chicken. *Infect Immun* **60**(9): 3546-3551.

**Klasing, K. C.** 1991. Avian inflammatory response: mediation by macrophages. *Poult Sci* **70**(5): 1176-1186.

- Klemm, P., et K. A. Krogfelt** 1994. Type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. Fimbriae: adhesion, genetics, biogenesis and vaccines. P. Klemm. Boca Raton, CRC press: 9-26.
- Koch, C.** 1986a. The alternative complement pathway in chickens. Purification of factor B and production of a monospecific antibody against it. Acta Path. Microbiol. Immunol. Scand., Se. C **94**, 253-259.
- Koch, C.** 1986b. A genetic polymorphism of the complement component factor B in chickens not linked to the major histocompatibility complex (MHC). Immunogenetics **23**(6): 364-367.
- Koch, C.** 1986c. Complement system in avian species. Avian immunology : Basis and Practice. A. Toivanen and P. Toivanen. Boca Raton, FL, USA, CRC Press.
- Kogut, M. H., C. Holtzapple, V. K. Lowry, K. Genovese, and L. H. Stanker** 1998. Functional responses of neonatal chicken and turkey heterophils following stimulation by inflammatory agonists. Am J Vet Res **59**(11): 1404-1448.
- Kogut, M. H.** 2002. Dynamics of a protective avian inflammatory response: the role of an IL-8-like cytokine in the recruitment of heterophils to the site of organ invasion by *Salmonella enteritidis*. Comp Immunol Microbiol Infect Dis **25**(3): 159-172.
- Kottom, T. J., L. K. Nolan, M. Robinson, J. Brown, T. Gustad, S. M. Horne, et C. W. Giddings** 1997. Further characterization of a complement-sensitive mutant of a virulent avian *Escherichia coli* isolate. Avian Dis **41**(4): 817-823.

**Kovacs E. J., D. Radzioch, H. A. Young, et L. Varesio** 1988. Differential inhibition of IL-1 and TNF-alpha mRNA expression by agents which block second messenger pathways in murine macrophages. *J Immunol* **141**(9): 3101-3105.

**Kuby J.** 1997. Immunology. Pp. 313-334. By Goldsby R.A., Kindt T. J., and B. A. Osborne (Eds. ). 3<sup>ed</sup> ed. New York W. H. Freeman & Co. and Sumanas, Inc.

**Lafont, J. P., M. Dho, H. M. D'Hauteville, A. Brée, et P. J. Sansonetti** 1987. Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**(1): 193-197.

**Lam, K. M.** 2002. The macrophage inflammatory protein-1beta in the supernatants of *Mycoplasma gallisepticum*-infected chicken leukocytes attracts the migration of chicken heterophils and lymphocytes. *Dev Comp Immunol* **26**(1): 85-93.

**Lamont, S. J.** 1998. The chicken major histocompatibility complex and disease. *Rev Sci Tech* **17**(1): 128-142.

**La Ragione R. M., R. J. Collighan, et M. J. Woodward** 1999. Non-curliation of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection. *FEMS Microbiol Lett* **175**(2): 247-253.

**La Ragione R. M., W. A. Cooley, et M. J. Woodward** 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol* **49**(4): 327-338.

**La Razione, R. M., I. M. McLaren, G. Foster, W. A. Cooley, et M. J. Woodward** 2002. Phenotypic and genotypic characterization of avian *Escherichia coli* O86:K61 isolates possessing a gamma-like intimin. *Appl Environ Microbiol* **68**(10): 4932-4942.

**Latimer, K. S., B. G. Harmon, J. R. Glisson, I. M. Kircher, et J. Brown** 1990. Turkey heterophil chemotaxis to *Pasteurella multocida* (serotype 3,4)-generated chemotactic factors. *Avian Dis* **34**(1): 137-140.

**Leveque G.,V. Forgetta, S. Morroll, A. L. Smith, N. Bumstead, P. Barrow, J. C. Loredó-Osti, K. Morgan, et D. Malo.** 2003. Allelic Variation in *TLR4* Is Linked to Susceptibility to *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Infection in Chickens. *Infec. Immun.* **71** (3) : 1116–1124.

**Law, D.** 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **7**(2): 152-173.

**Leclerc B, J. M. Fairbrother, M. Boulianne et S. Messier.** 2003. Evaluation of the adhesive capacity of *Escherichia coli* isolates associated with avian cellulitis. *Avian Dis.* **47**(1):21-31

**Lin, A. W., C. C. Chang, et C. C. McCormick** 1996. Molecular cloning and expression of an avian macrophage nitric-oxide synthase cDNA and the analysis of the genomic 5'-flanking region. *J Biol Chem* **271**(20): 11911-11919.

- Linggood, M. A., M. Roberts, S. Ford, S. H. Parry, et P. H. Williams** 1987. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J Gen Microbiol* **133**(4): 835-842.
- Lior, H.** 1994. Classification of *Escherichia coli*. *Escherichia coli in domestic animals and humans*. C. L. Gyles (Ed.) Guildford, UK, CAB International: 31-72.
- Lowenthal, J. W., J. J. York, T. E. O'Neil, S. Rhodes, S. J. Prowse, D. G. Strom, et M. R. Digby** 1997. *In vivo* effects of chicken interferon-gamma during infection with *Eimeria*. *J Interferon Cytokine Res* **17**(9): 551-8.
- Lowenthal, J. W., T. E. O'Neil, M. Broadway, A. D. Strom, M. R. Digby, M. Andrew, et J. J. York** 1998. Coadministration of IFN-gamma enhances antibody responses in chickens. *J Interferon Cytokine Res* **18**(8): 617-22.
- Lowenthal, J. W., T. E. O'Neil, A. David, G. Strom, et M. E. Andrew** 1999. Cytokine therapy: a natural alternative for disease control. *Vet Immunol Immunopathol* **72**(1-2): 183-8.
- Lunney, J. K.** 1998. Cytokines orchestrating the immune response. *Rev Sci Tech* **17**(1): 84-94.
- Madison, B., I. Ofek, S. Clegg, et S. N. Abraham** 1994. Type 1 fimbrial shafts of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* influence sugar-binding specificities of their FimH adhesins. *Infect Immun* **62**(3): 843-848.

**Mainil, J., et P. Pohl** 1994. Les souches attachantes et effacantes d'*Escherichia coli* d'origine bovine. Ann. Méd. Vét. **138**: 419-429.

**Mainil, J.** 2000. Le point des connaissances sur les entérites à *Escherichia coli* chez le veau. Ann. Méd. Vét. **144**: 121-136.

**Manca, M. C., A. Weintraub, et G. Widmalm.** 1996. Structural studies of the *Escherichia coli* O26 O-antigen polysaccharide. Carbohydr Res **281**:155-60.

**Manthey, C. L., P. Y. Perera, N. Qureshi, P. L. Stutz, T. A. Hamilton, et S. N. Vogel.** 1993. Modulation of lipopolysaccharide-induced macrophage gene expression by *Rhodobacter sphaeroides* lipid A and SDZ 880.431. Infect Immun **61**:3518-26.

**Marc, D., P. Arné, A. Brée, et M. Dho-Moulin** 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a *fim*- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. Res Microbiol **149**(7): 473-485.

**Marc, D., et M. Dho-Moulin.** 1996. Analysis of the *fim* cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within *fimA* and nucleotide sequence of *fimI*. J Med Microbiol **44**:444-52.

**Marletta, M. A., P. S. Yoon, R. Iyengar, C. D. Leaf, et J. S. Wishnok** 1988. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. Biochemistry **27**(24): 8706-8711.

- Maurer, J. J., T. P. Brown, W. L. Steffens, et S. G. Thayer** 1998a. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **42**(1): 106-118.
- Maurer J. J., M. D. Lee, C. Lobsinger, T. Brown, M. Maier, et S. G. Thayer** 1998b. Molecular typing of avian *Escherichia coli* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *Avian Dis* **42**(3): 431-451.
- Mavroidis, M., J. O. Sunyer, et J. D. Lambris** 1995. Isolation, primary structure, and evolution of the third component of chicken complement and evidence for a new member of the alpha 2-macroglobulin family. *J Immunol* **154**(5): 2164-2174.
- McConnell, C. D., B. M. Adair, et M. S. McNulty.** 1993. Effects of chicken anemia virus on cell-mediated immune function in chickens exposed to the virus by a natural route. *Avian Dis* **37**:366-74.
- Mellata, M., R. Bakour, E. Jacquemin, et J. G. Mainil** 2001. Genotypic and phenotypic characterization of potential virulence of intestinal avian *Escherichia coli* strains isolated in Algeria. *Avian Dis* **45**(3): 670-679.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss III, P. K. Brown, P. Arné, A. Brée, C. Desautels, et J. M. Fairbrother** 2003a. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**(1): 536-540.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss III, B. Lehoux, et J. M. Fairbrother** 2003b. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in



bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**(1): 494-503.

**Michalek, M. T., C. Mold, et E. G. Bremer** 1988. Inhibition of the alternative pathway of human complement by structural analogues of sialic acid. *J Immunol* **140**(5): 1588-1594.

**Milon, A., E. Oswald, et J. De Rycke** 1999. Rabbit EPEC: a model for the study of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* **30**(2-3): 203-219.

**Moll, A., P. A. Manning, et K. N. Timmis** 1980. Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the *traT* gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. *Infect Immun* **28**(2): 359-367.

**Montali, R. J.** 1988. Comparative pathology of inflammation in the higher vertebrates (reptiles, birds and mammals). *J Comp Pathol* **99**(1): 1-26.

**Morris, J. A., et W J. Sojka** 1985. *Escherichia coli* as a pathogen in animals, pp. 47-77. In M. Sussman (ed.) *The virulence of Escherichia coli.* London, Academic Press Inc LTd.

**Morris, M. P., et O. J. Fletcher** 1988. Disease prevalence in Georgia turkey flocks in 1986. *Avian Dis* **32**(3): 404-406.

**Muzio, M., D. Bosisio, N. Polentarutti, G. D'Amico, A. Stoppacciaro, R. Mancinelli, C. van't Veer, G. Penton-Rol, L. P. Ruco, P. Allavena, et A. Mantovani.** 2000. Differential expression and regulation of Toll-like receptors (TLR)

in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J. Immunol.* **164**:5998–6004.

**Nagai, S., T. Yagihashi, et A. Ishihama** 1998. An avian pathogenic *Escherichia coli* strain produces a hemolysin, the expression of which is dependent on cyclic AMP receptor protein gene function. *Vet Microbiol* **60**(2-4): 227-238.

**Nagy, G., U. Dobrindt, G. Schneider, A. S. Khan, J. Hacker, et L. Emody** 2002. Loss of regulatory protein RfaH attenuates virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**(8): 4406-4413.

**Nair, G. B., et Y. Takeda** 1997. The heat-labile and heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Escherichia coli mechanisms of virulence*. M. Sussman. Cambridge, Cambridge University Press: 237-256.

**Naslund, P. K., W. C. Miller, et D. L. Granger** 1995. *Cryptococcus neoformans* fails to induce nitric oxide synthase in primed murine macrophage-like cells." *Infect Immun* **63**(4): 1298-1304.

**Nataro, J. P., Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin, et M. M. Levine** 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cells and hemagglutination of human erythrocytes. *Infect Immun* **60**(6): 2297-2304.

**Nataro, J. P., J. Seriwatana, A. Fasano, D. R. Maneval, L. D. Guers, F. Noriega, F. Dubovsky, M. M. Levine, et J. G. Jr. Morris** 1995. Identification and cloning of

a novel plasmid-encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and Shigella strains. *Infect Immun* **63**(12): 4721-4728.

**Nataro, J. P., et J. B. Kaper** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.

**Ngeleka, M., B. Martineau-Doizé, et J. M. Fairbrother.** 1994. Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K'V165'F1651 resist killing by porcine polymorphonuclear leukocytes *in vitro*: Role of F1651 fimbriae and K'V165' O-antigen capsule. *Infect. Immun.* **62**: 398-404.

**Ngeleka, M., J. K. Kwaga, D. G. White, T. S. Whittam, C. Riddell, R. Goodhope, A. A. Potter, et B. Allan** 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. *Infect Immun* **64**(8): 3118-3126.

**Nolan, L. K., R. E. Wooley, J. Brown, K. R. Spears, H. W. Dickerson, et M. Dekich** 1992. Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **36**(2): 395-397.

**Nolan, L. K., R. E. Wooley, C. W. Giddings, et J. Brown** 1994. Characterization of an avirulent mutant of a virulent avian *Escherichia coli* isolate. *Avian Dis* **38**(1): 146-150.

**Ofek, I., et N. Sharon** 1988. Lectinophagocytosis: a molecular mechanism of recognition between cell surface sugars and lectins in the phagocytosis of bacteria. *Infect Immun* **56**(3): 539-547.

**Ofek, I., J. Goldhar, Y. Keisari, et N. Sharon.** 1995. Nonopsonic phagocytosis of microorganisms. *Annu Rev Microbiol* **49**:239-76.

**Ohta, H., Y. Yoshikawa, C. Kai, K. Yamanouchi, et H. Okada** 1984. Lysis of horse red blood cells mediated by antibody-independent activation of the alternative pathway of chicken complement. *Immunology* **52**(3): 437-444.

**Olsèn, A., A. Jonsson, et S. Normark** 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**(6217): 652-655.

**Olsèn, A., A. Arnqvist, M. Hammar, et S. Normark** 1993. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect Agents Dis* **2**(4): 272-274.

**Olsèn, A., M. J. Wick, M. Morgelin, et L. Bjorck** 1998. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect Immun* **66**(3): 944-949.

**Orndorff, P. E.** 1994. *Escherichia coli* type 1 pili. Molecular genetics of bacterial pathogenesis. V. L. Miller, J. B. Kaper, D. A. Portnoy and R. R. Isberg (eds.). Washington, DC, ASM: 91-111.

**Ørskov, F., et I. Ørskov** 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can J Microbiol* **38**(7): 699-704.

**Otto, B. R., S. J. Van Dooren, J. H. Nuijens, J. Luirink, et B. Oudega** 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J Exp Med* **188**(6): 1091-1103.

**Pages, J. M., J. M. Bolla, A. Bernadac, et D. Fourel** 1990. Immunological approach of assembly and topology of OmpF, an outer membrane protein of *Escherichia coli*. *Biochimie* **72**(2-3): 169-176.

**Panigrahy, B., et L. Yushen** 1990. Differentiation of pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* isolated from poultry. *Avian Dis* **34**(4): 941-943.

**Parmentier, H. K., R. Baelmans, M. G. Nieuwland, P. Dorny, et F. Demey** 2002. Haemolytic complement activity, C3 and Factor B consumption in serum from chickens divergently selected for antibody responses to sheep red blood cells. *Vet Immunol Immunopathol* **90**(1-2): 91-100.

**Pastoret, P.P., P. Griebel, H. Bazin, et A. Govaerts** 1998. *Handbook of Vertebrate Immunology*, Academic Press.

**Peighambari, S. M., J. P. Vaillancourt, R. A. Wilson, et C. L. Gyles** 1995. Characteristics of *Escherichia coli* isolates from avian cellulitis. *Avian Dis* **39**(1): 116-124.

**Pennycott, T. W., H. M. Ross, T. W. Pennycott, H. M. Ross, I. M. McLaren, A. Park, G. F. Hopkins, et G. Foster** 1998. Causes of death of wild birds of the family Fringillidae in Britain. *Vet Rec* **143**(6): 155-158.

**Persson K., W. Russell, M. Morgelin et H. Herwald.** 2003. The conversion of fibrinogen to fibrin at the surface of curled *Escherichia coli* bacteria leads to the generation of proinflammatory fibrinopeptides. *J Biol Chem.* **278 (34)**:31884-31890.

**Pfaff-McDonough S. J., S. M. Horne, C. W. Giddings, J. O. Ebert, C. Doetkott, M. H. Smith, et L. K. Nolan** 2000. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis* **44(1)**: 23-33.

**Pluschke, G., J. Mayden, M. Achtman, et R. P. Levine** 1983. Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun* **42(3)**: 907-913.

**Pluschke, G., et M. Achtman** 1984. Degree of antibody-independent activation of the classical complement pathway by K1 *Escherichia coli* differs with O antigen type and correlates with virulence of meningitis in newborns. *Infect Immun* **43(2)**: 684-692.

**Pourbakhsh, S. A., et J. M. Fairbrother** 1994. Purification and characterization of P fimbriae from an *Escherichia coli* strain isolated from a septicemic turkey. *FEMS Microbiol Lett* **122(3)**: 313-318.

**Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, C. M. Dozois, C. Desautels, et J. M. Fairbrother** 1997a. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Dis* **41(1)**: 221-233.

**Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, B. Martineau-Doize, et J. M. Fairbrother** 1997b. Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **22**(6): 331-341.

**Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, et J. M. Fairbrother** 1997c. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* **58**(2-4): 195-213.

**Powell, P. C.** 1987. Macrophages and other nonlymphoid cells contributing to immunity. *Avian Immunology: Basis and Practice*. I. A. Toivanen and P. Toivanen. Boca Raton, FL, CRC Press. **Vol. 1**: 195-212.

**Pratt, L. A., et R. Kolter** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**(2): 285-293.

**Provence, D. L., et R. Curtiss III** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect Immun* **60**(11): 4460-4467.

**Provence, D. L., et R. Curtiss III** 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **62**(4): 1369-1380.

**Puzzi, J. V., L. D. Bacon, et R. R. Dietert** 1990. B-congenic chickens differ in macrophage inflammatory responses. *Vet Immunol Immunopathol* **26**(1): 13-30.

**Qureshi, M. A., R. R. Dietert, et L. D. Bacon** 1986. Genetic variation in the recruitment and activation of chicken peritoneal macrophages. *Proc Soc Exp Biol Med* **181**(4): 560-568.

**Qureshi, M. A., R. R. Dietert, et L. D. Bacon** 1988. Chemotactic activity of chicken blood mononuclear leukocytes from 15I5-B-congenic lines to bacterially-derived chemoattractants. *Vet Immunol Immunopathol* **19**(3-4): 351-360.

**Qureshi, M. A., et L. Miller** 1991. Comparison of macrophage function in several commercial broiler genetic lines. *Poult Sci* **70**(10): 2094-2101.

**Qureshi, M. A., C. L. Heggen, et I. Hussain** 2000. Avian macrophage: effector functions in health and disease. *Dev Comp Immunol* **24**(2-3): 103-119.

**Randall, C. J., P. A. Meakins, M. P. Harris, et D. J. Watt** 1984. A new skin disease in broilers? *Vet Rec* **114**(10): 246.

**Reisner, A., J. A. Haagensen, M. A. Schembri, E. L. Zechner, et S. Molin** 2003. Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Mol Microbiol* **48**(4): 933-946.

**Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, et M. L. Cohen** 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**(12): 681-685.



**Robbins J. B., G. H. Jr. McCracken, E. C. Gotschlich, F. Ørskov, I. Ørskov, et L. A. Hanson** 1974. *Escherichia coli* K1 capsular polysaccharide associated with neonatal meningitis. *N Engl J Med* **290**(22): 1216-1220.

**Roberts, I. S.** 1996. The biochemistry and genetics of capsular polysaccharide production in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**: 285-315.

**Rosenberger, J. K., P. A. Fries, et S. S. Cloud** 1985. *In vitro* and *in vivo* characterization of avian *Escherichia coli*. III. Immunization. *Avian Dis* **29**(4): 1108-1117.

**Rozenberg-Arska, M., M. E. Salters, J. A. Van Strijp, J. J. Geuze, et J. Verhoef** 1985. Electron microscopic study of phagocytosis of *Escherichia coli* by human polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **50**(3): 852-859.

**Russell, D. G.** 2000. What is the very model of a modern macrophages pathogen? pp. 107-117. *In* K. Brogden, J. A. Roth, T. B. Stantonet (eds.) *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. Washington, ASM Press.

**Russo, TA.** 2002. Capsule and Lipopolysaccharide. Pp. 379-403. *In* MS. Donnenberg (ed.). *Escherichia coli*, virulence mechanisms and a versatile pathogen. Academic Press, California (USA)..

**Schaeffer, A. J., W. R. Schwan, S. J. Hultgren, et J. L. Duncan** 1987. Relationship of type 1 pilus expression in *Escherichia coli* to ascending urinary tract infections in mice. *Infect Immun* **55**(2): 373-380.

**Sekizaki, T., N. Terakado, et K. Hashimoto** 1984. Cloning and comparison of heat-stable enterotoxin genes from *Escherichia coli* strains of bovine, porcine, and avian origins. *Am J Vet Res* **45**(2): 314-318.

**Sen, K., et H. Nikaido** 1991. Lipopolysaccharide structure required for *in vitro* trimerization of *Escherichia coli* OmpF porin. *J Bacteriol* **173**(2): 926-828.

**Sharma JM.** 2003. The avian immun system. *In.* Saif YM., Barnes HJ., JR. Glisson, AM. Fadly, LR. McDougald et DE. Swayne (eds.). *Diseases of poultry*. 11<sup>th</sup> Ed. Iowa State Press (USA). Pp. 5-16.

**Shen, P. F., E. J. Smith, et L. D. Bacon** 1984. The ontogeny of blood cells, complement, and immunoglobulins in 3- to 12-week-old 1515-B congenic white Leghorn chickens. *Poult Sci* **63**(6): 1083-1093.

**Silverblatt, F. J., J. S. Dreyer, et S. Schauer** 1979. Effect of pili on susceptibility of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun* **24**(1): 218-223.

**Staheli, P., F. Puehler, K. Schneider, T. W. Gobel, et B. Kaspers** 2001. Cytokines of birds: conserved functions--a largely different look. *J Interferon Cytokine Res* **21**(12): 993-1010.

**Stathopoulos, C., D. L. Provence, et R. Curtiss III** 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect Immun* **67**(2): 772-781.

- Stawski, G., L. Nielsen, F. Ørskov, et I. Ørskov** 1990. Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia coli* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon. *Apmis* **98**(9): 828-838.
- Stearns, R. C., G. M. Barnas, M. Walski, et J. D. Brain** 1987. Deposition and phagocytosis of inhaled particles in the gas exchange region of the duck, *Anas platyrhynchos*. *Respir Physiol* **67**(1): 23-36.
- Steele, R. W.** 1991. Clinical applications of chemiluminescence of granulocytes. *Rev Infect Dis* **13**(5): 918-925.
- Stinavage, P. S., L. E. Martin, et J. K. Spitznagel** 1990. A 59 kiloDalton outer membrane protein of *Salmonella typhimurium* protects against oxidative intraleukocytic killing due to human neutrophils. *Mol Microbiol* **4**(2): 283-293.
- Strömberg, N., B. I. Marklund, B. Lund, D. Ilver, A. Hamers, W. Gaastra, K. A. Karlsson, et S. Normark** 1990. Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal alpha 1-4Gal-containing isoreceptors. *Embo J* **9**(6): 2001-2010.
- Stuehr, D. J., et M. A. Marletta** 1985. Mammalian nitrate biosynthesis: mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(22): 7738-7742.
- Sung, Y. J., J. H. Hotchkiss, R. E. Austic, et R. R. Dietert** 1991. L-arginine-dependent production of a reactive nitrogen intermediate by macrophages of a uricotelic species. *J Leukoc Biol* **50**(1): 49-56.

**Sung, Y. J., et R. R. Dietert** 1994. Nitric oxide (NO)-induced mitochondrial injury among chicken .NO-generating and target leukocytes. *J Leukoc Biol* **56**(1): 52-58.

**Supek, F., L. Supekova, H. Nelson, et N. Nelson.** 1996. A yeast manganese transporter related to the macrophage protein involved in conferring resistance to mycobacteria. *Biochemistry.* **93** (10): 5105-5110.

**Suresh, M., K. Karaca, D. Foster, et J. M. Sharma** 1995. Molecular and functional characterization of turkey interferon. *J Virol* **69**(12): 8159-8163.

**Sussman, M.** 1997. *Escherichia coli* mechanisms of virulence. Cambridge, Cambridge University Press.

**Suwanichkul, A., B. Panigrahy, et R. M. Wagner** 1987. Antigenic relatedness and partial amino acid sequences of pili of *Escherichia coli* serotypes O1, O2, and O78 pathogenic to poultry. *Avian Dis* **31**(4): 809-813.

**Svanborg Eden C., L. M. Bjursten, R. Hull, S. Hull, K. E. Magnusson, Z. Moldovano, et H. Leffler** 1984. Influence of adhesins on the interaction of *Escherichia coli* with human phagocytes. *Infect Immun* **44**(3): 672-680.

**Svanborg-Edén C., L. Hagberg, R. Hull, S. Hull, K. E. Magnusson, et L. Ohman** 1987. Bacterial virulence versus host resistance in the urinary tracts of mice. *Infect Immun* **55**(5): 1224-1232.

**Tamir, H., et S. Ratner** 1963. Enzymes of Arginine Metabolism in Chicks. *Arch Biochem Biophys* **102**: 249-58.

**Taylor, W.** 1995. Resistance of bacteria to complement. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. J. Roth, C. Bolin, K. Brogden, F. Minion and M. Wannemuehler. Washington, D.C., ASM press: 49-64.

**Tewari, R., T. Ikeda, R. Malaviya, J. I. MacGregor, J. R. Little, S. J. Hultgren, et S. N. Abraham** 1994. The PapG tip adhesin of P fimbriae protects *Escherichia coli* from neutrophil bactericidal activity. *Infect Immun* **62**(12): 5296-5304.

**Thankavel, K., B. Madison, T. Ikeda, R. Malaviya, A. H. Shah, P. M. Arumugam, et S. N. Abraham** 1997. Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J Clin Invest* **100**(5): 1123-1136.

**Toth, T. E., et P. B. Siegel** 1986. Cellular defense of the avian respiratory tract: paucity of free-residing macrophages in the normal chicken. *Avian Dis* **30**(1): 67-75.

**Toth, T. E., P. Siegel, et H. Veit** 1987. Cellular defense of the avian respiratory system. Influx of phagocytes: elicitation versus activation. *Avian Dis* **31**(4): 861-867.

**Toth, T. E., et P. B. Siegel** 1993. Cellular defense of the avian respiratory system: dose-response relationship and duration of response in intratracheal stimulation of avian respiratory phagocytes by a *Pasteurella multocida* bacterin. *Avian Dis* **37**(3): 756-762.

**Tsuji, T., J. E. Joya, T. Honda, et T. Miwatani** 1990. A heat-labile enterotoxin (LT) purified from chicken enterotoxigenic *Escherichia coli* is identical to porcine LT. FEMS Microbiol Lett **55**(3): 329-332.

**Vandemaele F. J., J. P. Mugasa, D. Vandekerchove, et B. M. Goddeeris.** 2003. Predominance of the *papGII* allele with high sequence homology to that of human isolates among avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet. Microbiol. **97** : 245-257.

**Van den Bosch, J. F., J. H. Hendriks, I. Gladigau, H. M. Willems, P. K. Storm, et F. K. de Graaf** 1993. Identification of F11 fimbriae on chicken *Escherichia coli* strains. Infect Immun **61**(3): 800-806.

**Van Nerom, A., M. Desmidt, R. Ducatelle, et F. Haesebrouck** 1997. Lucigenin- and luminol-enhanced chemiluminescence in turkey monocytes. J Biolumin Chemilumin **12**(4): 207-214.

**Van Nerom, A. E., R. Ducatelle, et F. Haesebrouck** 1998. Oxygen radicals and nitric oxide production by turkey respiratory macrophages. Dev Comp Immunol **22**(4): 407-416.

**Vandemaele, F., D. Vandekerchove, M. Vereecken, J. Derijcke, M. Dho-Moulin, et B. M. Goddeeris** 2003. Sequence analysis demonstrates the conservation of fimH and variability of fimA throughout avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res **34**(2): 153-163.

**Vegad, J. L., et A. K. Katiyar** 1995. The acute inflammatory response in the chicken. *vetrinary Bulletin*. **65 (5)**: 399-409.

**Verweyen, H. M., H. Karch, Brandis M, et L.B. Zimmerhackl** 2000. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: following transmission routes. *Pediatr Nephrol* **14(1)**: 73-83.

**Vidal, S. M., E. Pinner, P. Lepage, S. Gauthier, et P. Gros** 1996. Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J Immunol* **157(8)**: 3559-3568.

**Vidal, O., R. Longin, C. Prigent-Combaret, C. Dorel, M. Hooreman, et P. Lejeune** 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new ompR allele that increases curli expression. *J Bacteriol* **180(9)**: 2442-2449.

**Vidotto, M. C., H. R. Navarro, et L. C. Gaziri** 1997. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **59(1)**: 79-87.

**Wannemuehler, M.** 1995. Bacterial resistance to cellular defense mechanisms. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. J. Roth, C. Bolin, K. Brogden, F. Minion and M. Wannemuehler. Washington D.C., ASM Press: 97-169.

**Waters, V. L., et J. H. Crosa** 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* **55(3)**: 437-450.

**Wathen, L. K., D. LeBlanc, C. M. Warner, S. J. Lamont, et A. W. Nordskog** 1987. A chicken sex-limited protein that crossreacts with the fourth component of complement. *Poult Sci* **66**(1): 162-165.

**Weining, K. C., C. Sick, B. Kaspers, et P. Staeheli.** 1998. A chicken homolog of mammalian interleukin-1 beta: cDNA cloning and purification of active recombinant protein. *Eur J Biochem* **258**:994-1000.

**White, D. G., R. A. Wilson, D. A. Emery, K. V. Nagaraja, et T. S. Whittam** 1993a. Clonal diversity among strains of *Escherichia coli* incriminated in turkey colisepticemia. *Vet Microbiol* **34**(1): 19-34.

**White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson, et T. S. Whittam** 1993b. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb Pathog* **14**(5): 399-409.

**Wooley, R. E., K. R. Spears, J. Brown, L. K. Nolan, et O. J. Fletcher** 1992. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **36**(3): 679-684.

**Wooley, R. E., L. K. Nolan, J. Brown, P. S. Gibbs, C. W. Giddings, et K. S. Turner** 1993. Association of K-1 capsule, smooth lipopolysaccharides, *traT* gene, and Colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **37**(4): 1092-1096.



**Wooley, R. E., P. S. Gibbs, T. P. Brown, et J. J. Maurer** 2000. Chicken embryo lethality assay for determining the virulence of avian *Escherichia coli* isolates. *Avian Dis* **44**(2): 318-324.

**Yogarathnam, V.** 1995. Analysis of the causes of high rates of carcass rejection at a poultry processing plant. *Vet Rec* **137**(9): 215-217.

**Yonemasu, K., et T. Sasaki** 1986. Purification, identification and characterization of chicken C1q, a subcomponent of the first component of complement. *J Immunol Methods* **88**(2): 245-253.

**Zarembek, K. A., et P. J. Godowski.** 2002. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* **168**:554-561.

**Zekarias, B., A. A. Ter Huurne, W. J. Landman, J. M. Rebel, J. M. Pol, et E. Gruys** 2002. Immunological basis of differences in disease resistance in the chicken. *Vet Res* **33**(2): 109-125.

**ANNEXE A. Composition chimique des différents sérotypes de *E. coli***

Sérotype	Composition en sucres
O1	L-rhamnose, D-galactose, <i>N</i> -acetyl-D-glucosamine, <i>N</i> -acetyl-D-mannosamine
O2	L-rhamnose, D-galactose, 2-amino-2-deoxy-D-glucose, 3-amino-3,6-dideoxy-D-galactose, D-glucose, heptose
O78	D-mannose, glucose, galactose, 2-amino-2-deoxy-D-glucose, heptose.
O111	D.galactose, D.glucose, <i>N</i> -acetylglucosamine, colitose.
O26	L-rhamnose, L-fucosamine, 2-amino-2-deoxy-D-glucose.