

2m11.3443.8

Université de Montréal

PURIFICATION ET ÉTUDES TOXICOLOGIQUES DES VARIANTS O42
ET 17-2 DE L'ENTÉROTOXINE EAST1 (ENTEROAGGREGATIVE
ESCHERICHIA COLI HEAT-STABLE TOXIN 1)

par

SOPHIE VEILLEUX

Département de pathologie et microbiologie
Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Avril 2006

©Sophie Veilleux, 2006



SF
607
154
2006
v1028

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

Ce mémoire intitulé

PURIFICATION ET ÉTUDES TOXICOLOGIQUES DES VARIANTS O42 ET
17-2 DE L' ENTÉROTOXINE EAST1 (*ENTEROAGGREGATIVE Escherichia coli*
HEAT-STABLE TOXIN I)

Présenté par

Sophie Veilleux

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Dr. Khyali Mittal, président-rapporteur

Dr. J. Daniel Dubreuil, directeur de recherche

Dr. Réjean Beaudet, membre du jury

**Résumé en français
et mots-clés**

La toxine EAST1, un peptide de 38 acides aminés ayant un poids moléculaire de 4.1kDa, fut mise en évidence pour la première fois à partir de *Escherichia coli* 17-2 (O3:H2) isolée des selles d'un enfant Chilien souffrant de diarrhée (Savarino *et al.* 1991). Dans le cadre de cette maîtrise, une nouvelle méthode de purification de la toxine EAST1 (O42 et 17-2) fut mise au point. Cette nouvelle méthode prend comme modèle le protocole de purification de EAST1 élaboré par Ménard *et al.* (2004). Cette nouvelle méthode permet d'augmenter la quantité de toxine EAST1 purifiée. Ménard *et al.* (2004) rapportent obtenir 0.29 mg de toxine EAST1 pure pour 1 litre de bouillon de culture. Les modifications apportées au protocole nous permettent d'obtenir respectivement 10 mg de toxine EAST1 O42 et 4.5mg de toxine EAST1 17-2 par litre de bouillon de culture. Suite à l'obtention de EAST1 (O42 et 17-2) purifié, des tests de toxicité furent effectués à l'aide des chambres de Ussing et des tests de souriceaux. Il semble que le test des souriceaux ne convient pas à l'étude de EAST1. Ce test d'entérototoxicité aussi nommé « *Suckling mouse assay* » constitue la méthode de référence pour la toxine STa (Giannella, 1976). Les chambres de Ussing, furent utilisées pour l'étude de l'entétoxicité des variants O42 et 17-2 de EAST1. Le modèle cellulaire T84 semble plus sensible que les cellules IPEC J2 pour l'étude de l'entérototoxicité de la toxine EAST1.

Mot-clés : EAST1, toxine, chromatographie, souriceaux, chambres de Ussing, pont disulfure, cellules.

**Résumé en anglais
et mots-clés**

EAST1 was first discovered in EAEC strain 17-2 isolated from the stools of a Chilean child suffering of diarrhea. It is a peptide of 38 amino acids with a molecular weight of 4.1 kDa. The study undertaken was conducted in order to improve an already described purification protocol for EAST1 toxin to obtain more rapidly and in greater amount of both EAST1 variants. Since EAST1 is often compared to STa the molecules were tested for biological activity using the suckling mouse assay, the reference test for STa. As well, Ussing chambers was tested using two cell lines in order to evaluate and compared the biological activity of both EAST1 variants purified following this new protocol. Our study has shown that EAST1 toxin can be purified in larger quantity using affinity chromatography. From 1L of bacterial culture we obtained about 3 times more toxin compared to the quantity of EAST1 17-2 obtained by Ménard *et al.* (2004) (0.925 compared to 0.290 mg). Many of the time consuming steps used by Ménard *et al.* (2004), as dialysis for example, were replaced by quicker steps. Our results indicate that CD-1 mouse may not be a suitable animal model for the study of EAST1 since no enterotoxicity was observed. In Ussing chambers, IPEC J2 cells were less sensitive to EAST1 toxin compared to T84 cells, since less significant ΔI_{sc} values were observed using the IPEC J2 cells, for all EAST1 samples tested.

Key words: EAST1, toxin, chromatography, suckling mouse assay, Ussing chambers, disulfide bridge, cells.

Table des matières

Résumé en français	i
Résumé en anglais	iii
Table des matières	v
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	x
Recension de la littérature	xi
Liste des sigles et abréviations	xii
Remerciements	xv
Introduction.....	1
Recension de la littérature	8
<i>Escherichia coli</i>	9
<i>Les EAEC</i>	9
<i>Épidémiologie des EAEC</i>	12
<i>EAST1 (généralités)</i>	14
<i>Structure de EAST1</i>	16
<i>Variants de EAST1</i>	18
<i>Comparaison de EAST1 avec STa</i>	20
<i>Mécanisme d'induction de la diarrhée et récepteur de EAST1</i>	21
<i>Épidémiologie de EAST1</i>	22
<i>L'association de EAST1 avec les facteurs d'adhérence F4 et CS31A</i>	25
<i>Tests de toxicité</i>	27
<i>Nombre d'acide aminée</i>	32
<i>Références</i>	32
Article 1	34
<i>Abstract</i>	37
<i>Table of contents</i>	38
<i>1. INTRODUCTION</i>	39
<i>2. EAST1 GENE</i>	41
<i>3. EAST1 TOXIN</i>	41
<i>4. EPIDEMIOLOGY OF EAST1 STRAINS</i>	43
<i>5. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES</i>	52
<i>ACKNOWLEDGEMENTS</i>	54
<i>REFERENCES</i>	55
Résultats.....	64
Article 2	65
<i>Abstract</i>	68
<i>Introduction</i>	69
<i>Materials and methods</i>	73
<i>Results</i>	78
<i>Discussion</i>	82
<i>ACKNOWLEDGEMENTS</i>	85
<i>Discussion</i>	92
<i>Conclusion</i>	105
Annexe I.....	xii

Liste des tableaux

Recension de la littérature

Tableau I. Comparaison des séquences protéiques des toxines EAST1 O42, EAST1 17-2, STa (humain), STa (porcin) et de la guanyline humaine	32
Tableau II. Comparaison des séquences protéiques de 8 variants de EAST1.....	33

Article 1

Tableau I. Primary sequences comparison of four heat-stable toxins elaborated by <i>E.coli</i>	63
--	----

Article 2

Tableau I. Comparison of the quantity of EAST1 toxin (mg) purified from 1L of bacterial culture broth using Ménard <i>et al.</i> (2004) or the method described in this study.....	86
Table II: Samples tested and G/B ratio obtained in the suckling mice assay when testing EAST1 toxin variants 17-2 and O42 treated or not with protein disulfide isomerase (PDI).....	86
Table III: Ussing chambers results, using IPEC J2 and T84 cells as cellular model, forskolin (10 μ M) as positive control and Ringer solution and PDI mix as negative controls.....	87

Discussion

Tableau III. Description des différences entre la méthode de production de toxine EAST1 élaborée par Ménard <i>et al.</i> (2004) et celle mise au point dans le cadre de ce projet de maîtrise.....	103
Tableau IV. Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des tests d'entérotoxicités sur les souriceaux nouveaux-née.....	104

Liste des figures

Recension de la littérature

Figure 1. Comparaison des séquences nucléotidique et protéique des variants O42 et 17-2 de la toxine EAST1.....	31
---	----

Article 2

Figure 1: Comparison of the elution profil of soybean trypsin inhibitor (26 kDa), egg white lysozyme (14.1 kDa), aprotinin (6.5 kDa) and EAST1 O42, using a Superdex G-75 column (Pharmacia) coupled to an AKTA purifier 10 purification system (GE Healthcare).....	88
--	----

Liste des sigles et abréviations

AAF: « Aggregative adherence fimbriae »
astA: gène codant pour la toxine EAST1
CFU: Unité formatrice de colonie
CNF: “Cytotoxic necrotizing factor”
DAEC: *E. coli* à adhérence diffuse
EAEC: *E. coli* entéroagréatif
EAST1: “Enteraggative *E. coli* heat-stable toxin 1”
EAST1EC: “Enteraggative *E. coli* heat-stable toxin 1 *E. coli*”
EHEC: *E. coli* entérohémorragique
EIEC: *E. coli* entéroinvasif
EPEC: *E. coli* entéropathogène
ETEC: *E. coli* entérotoxigène
GC: Guanylate cyclase
GMPc: Guanosine monophosphate cyclique
GST: Glutathione-*s*-transférase
HIV: Virus de l'immunodéficience humaine
IPEC :”Intestinal pig epithelial cells”
IS: “Insertion sequence”
kD: KiloDalton
LT: Toxine labile à la chaleur de *E. coli*
N-terminal: Amino-terminal
PCR: « Polymerase chain reaction »
PDI : « Protein-disulfide isomerase »
Pet: « Plasmid-encoded toxin »
pI: point isoélectrique
ST: toxine stable à la chaleur
STa: Toxine de type a stable à la chaleur
STb: Toxine de type b stable à la chaleur
STEC: “Shiga toxin- producing *E. coli*”
Stx1: Shiga toxin 1
Stx2: Shiga toxin 2
VTEC: « Verotoxin- producing *E. coli* »

À mes parents que j'adore et admire.

Remerciements

Je tiens à remercier, de tout coeur, ceux et celles qui ont contribué à la réalisation de mes études aux cycles supérieurs et particulièrement :

Dr. J. Daniel Dubreuil, mon directeur de recherche, pour m'avoir accepté au sein de son laboratoire et guidé tout au long de ma maîtrise.

Carina Gonçalves, étudiante au laboratoire de Dr. Dubreuil, pour m'avoir offert son support technique et psychologique.

Stéphanie Penel, étudiante au laboratoire de Dr. Dubreuil, pour m'avoir offert son support technique et psychologique.

Carmen Veilleux, technicienne au cégep de Sherbrooke, pour son aide technique précieuse lors des expérimentations *in vivo*.

Natalee Holt, étudiante à l'Université du Kansas, pour son aide technique lors des tests de chambres de Ussing.

sans oublier,

Mes parents, Nicole et Yvon Veilleux, sans eux rien de tout cela n'aurait été possible.....

Introduction

Escherichia coli est un bacille Gram-négatif, anaérobie facultatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* fait partie de la flore intestinale normale des humains et des animaux. Bien que la majorité des souches d' *E. coli* font partie de la flore intestinale normale de leur hôte, dû à la présence de facteurs de virulence, certaines souches sont pathogènes. On classe les *E. coli* pathogènes en pathotypes, correspondant aux facteurs de virulence qu'ils possèdent. Les 6 pathotypes connus sont: *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* entéroagrégatifs (EAEC), *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) et les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) (Kaper *et al.* 2004).

Les EAEC sont aujourd'hui reconnus comme étant d'importants pathogènes entériques associés à des cas de diarrhée (aiguë et/ou persistante) et d'empoisonnement alimentaire (Tsai *et al.* 2003). Ils sont, en effet, mis en cause dans des cas de diarrhée chez les touristes (tourista), les enfants des pays en voie de développement et les patients HIV-positifs (Huang *et al.* 2004 et Germani *et al.* 1998). Les EAEC présentent une adhérence, mannose-résistant, aux cellules épithéliales humaines (HEp-2) avec un motif nommé "auto-agrégatif" et ne produisent pas de toxines labiles (LT) ou stables (ST) à la chaleur (Kaper *et al.* 2004 et Savarino *et al.* 1993). La pathophysiologie des diarrhées à EAEC ainsi que les marqueurs de virulence permettant à ces bactéries de causer la diarrhée sont peu connus (Jiang *et al.* 2002). Des études, menées à l'aide de volontaires, permettent de croire que la virulence des souches EAEC humaine est hétérogène sur les plans phénotypique et génétique (Czeczulin *et al.* 1999). Parmi les autres facteurs de virulence des EAEC notons les fimbriae AAFI et AAFII, la cytotoxine Pet, des

hémolysines, diverses protéines de la membrane externe et plusieurs entérotoxines dont EAST1 pour « enteroaggregative E. coli heat-stable toxin 1 ».

La toxine EAST1 fut mise en évidence pour la première fois à partir de la souche EAEC 17-2 (O3:H2) isolée des selles d'un enfant Chilien souffrant de diarrhée (Savarino *et al.* 1991). Par la suite, diverses études associèrent EAST1 à des pathotypes autres que les EAEC, tel que les EHEC, les ETEC, DAEC, les « shiga toxin-producing *E. coli* » (STEC) et les « verotoxin-producing *E. coli* » (VTEC), ainsi qu'aux genres bactériens *Salmonella* et *Klebsiella* (Yamamoto *et al.* 1996; Morabito *et al.* 1998; Stephan *et al.* 1999; Paiva de Sousa et Dubreuil 2001; Nguyen Thi *et al.* 2003; Blanco *et al.* 2005; Lopes *et al.* 2005). La toxine EAST1 est encodée par un cadre de lecture ouvert de 117pb nommé *astA* pour « EAEC heat-stable enterotoxin » (Ménard et Dubreuil, 2002). Le gène *astA*, codant pour EAST1, est associé à des souches d' *E. coli* d'origine humaine et animale (Vu-Khac *et al.* 2004). Le gène *astA* peut être retrouvé sous forme chromosomique et/ou plasmidique en une ou plusieurs copies. Lorsque testé, à l'aide du modèle des chambres de Ussing, la toxine EAST1 induit une augmentation du courant électrique démontrant ainsi sa capacité à induire la diarrhée (Zhou *et al.* 2002).

La toxine EAST1 est un peptide de 38 acides aminés ayant un poids moléculaire de 4.1kDa et un point isolélectrique (pI) calculé de 9.25. EAST1 possède quatre cystéines qui sont impliquées dans la formation de deux ponts disulfures. Une étude de spectrométrie de masse a permis de déterminer que les deux ponts disulfures ont une conformation C1-C2 et C3-C4 (Ménard *et al.* 2004). En utilisant un peptide synthétique correspondant aux acides aminés 8 à 29 de EAST1, Savarino *et al.* (1993) ont observé une réponse toxique en utilisant le modèle des chambres de

Ussing (Voir Tableau I p.32). La séquence du gène *astA*, encodant la toxine EAST1 de la souche EAEC O42 (O44:H18), est largement distribuée chez les souches d' *E. coli* responsables de diarrhée. Un variant de EAST1, produit par la souche EAEC 17-2 (O3:H2) diffère d'une base au codon 21 (ACA → GCA) entraînant une substitution de la thréonine par une alanine (Ménard et Dubreuil 2002; Yamamoto *et al.* 1997).

La toxine EAST1 est structurellement et fonctionnellement semblable à la guanyline, une hormone endogène de l'humain et à STa une autre entérotoxine d' *E. coli*. Nous croyons, sans qu'il n'y ait de preuve directe, que EAST1 active la guanylate cyclase-C (GC-C) présente au niveau des cellules épithéliales intestinales permettant la production de GMPc, comme il a été observé pour l'entérotoxine STa (Osek, 2003 et Greenberg *et al.* 1997). L'augmentation de GMPc, dans l'intestin, entraîne une diminution de l'absorption de l'eau et des ions sodium ainsi que l'augmentation de la sécrétion des ions chlore, menant ultimement à l'apparition d'une diarrhée aqueuse (Currie *et al.* 1992).

Des épisodes de diarrhée impliquant des souches possédant le gène *astA* ont été décrits dans plusieurs régions du globe. Parmi ceux-ci, un épisode de gastro-entérite causé par une souche de *E. coli* O166:H15, possédant EAST1 comme seul facteur de virulence connu, a eu lieu en 1996 à Osaka, Japon (Zhou *et al.* 2002).

Peu d'étude font mention de la détermination de la toxicité pour EAST1. En effet, la plupart des études détectent, par PCR, le gène *astA* chez des souches d' *E. coli*. Par contre, la détection d'un gène chez une souche bactérienne ne garantit en rien la production et la sécrétion d'une protéine complète, fonctionnelle et en quantité suffisante pour causer des symptômes chez l'hôte. Les tests de toxicité répertoriés, dans la littérature, pour EAST1 ont été effectués en utilisant des filtrats de

surnageants de bactéries produisant la toxine EAST1, puisque la purification à homogénéité de EAST1 est récente (Savarino *et al.* 1996; 1991 ; Nataro *et al.* 1995 et Ménard *et al.* 2004). L'utilisation de toxine purifiée facilite la standardisation des quantités de toxine testées. Des études, utilisant le « suckling mouse assay » comme modèle, ont tenté de démontrer l'entérototoxicité de EAST1, sans succès, à l'aide de souriceaux, la méthode de référence pour la toxine STa (Giannella 1976). Parmi celles-ci, mentionnons Ménard *et al.* 2004, qui ont utilisé une variante de la méthode de Giannella pour évaluer l'activité entérotoxique de la toxine EAST1 17-2 purifiée à homogénéité. En utilisant des souriceaux CD-1, Ménard *et al.* (2004) n'ont observé aucune entérototoxicité. Une autre méthode, les chambres de Ussing n'ont, à notre connaissance, jamais été utilisées pour tester l'entérototoxicité de EAST1 purifiée. Cette technique possède l'avantage de permettre de tester différents types de tissus provenant de divers modèles animaux et diverses lignées de cellules en culture. Une autre méthode *in vitro*, le "*suckling mouse intestinal loop assay*", utilisée pour la toxine STa, pourrait être envisagée lors de l'étude de EAST1. L'avantage de ce test est l'absence de passage de l'échantillon dans l'estomac, où on retrouve plusieurs protéases. Les risques de perdre l'effet toxique, par protéolyse de l'échantillon, sont ainsi diminués (Greenberg *et al.* 1997).

Dans le cadre de cette maîtrise, une nouvelle méthode de purification de la toxine EAST1 (O42 et 17-2) fut mise au point. Cette nouvelle méthode prend comme modèle le protocole de purification de EAST1 élaboré par Ménard *et al.* (2004). Dans un premier temps, la protéine de fusion GST (glutathione-*s*-transférase)-EAST1 est obtenue par lyse cellulaire de la souche *E. coli* BL21 exprimant la protéine de fusion. La protéine de fusion est purifiée par une étape de chromatographie d'affinité puis

clivée par le facteur Xa (Roche Biosciences). Par la suite, une deuxième étape de chromatographie d'affinité est effectuée afin d'éliminer la GST de l'échantillon et de récupérer la toxine EAST1 purifiée. Une étape de désalage, par chromatographie, est utilisée pour obtenir la toxine dans le tampon de notre choix.

Afin de s'assurer de l'intégrité des ponts disulfure de la toxine une partie des échantillons de toxine EAST1 O42 et 17-2 furent traités à l'aide de la « Protein-disulfide isomerase » (PDI) (Sigma), une enzyme permettant la formation des ponts disulfures chez des protéines dénaturées tel que l'insuline.

Suite à l'obtention de EAST1 (O42 et 17-2) purifié, traitée ou non à l'aide de la PDI, des tests de toxicité furent effectués à l'aide des chambres de Ussing et des tests de souriceaux. Pour les chambres de Ussing les lignées cellulaires IPEC J2 et T84 furent utilisées. La lignée IPEC J2 consiste en des cellules épithéliales d'intestin (jéjunum) de porc immortalisées. Quant aux cellules T84 ce sont des cellules épithéliales de colon humain. Les cellules furent fixées en monocouche sur une membrane et baignée dans de la solution de Ringer et 5% de CO₂ dans la chambre de Ussing. Les échantillons ont été ajoutés sur la face apicale des cellules. Pour chaque test de la Forskolin (10μM) fut utilisée comme témoin positif et de la solution des Ringer comme témoin négatif.

En ce qui concerne les tests de souriceaux, la lignée de CD-1, aussi nommée Swiss albino, fut utilisée en accord avec la méthode décrite par Giannella (1976). Dans un premier temps, différents groupes de 5 souriceaux (3-5 jours) reçurent diverses préparations toxiques (O42 ou 17-2) afin d'évaluer l'activité entérotoxique de EAST1 O42 et 17-2 dans ce modèle. L'entérotoxine STa fut utilisée comme témoin positif et de l'eau stérile, ou le tampon approprié, comme témoin négatif. Par la suite, de

nouveaux groupes de 5 souriceaux reçurent diverses concentrations de toxine EAST1 O42 ou 17-2 préalablement traité avec l'enzyme « protein-disulfide isomerase » (sigma). Dans ce cas, le témoin négatif utilisé est la solution maîtresse utilisé lors du traitement avec la PDI.

Recension de la littérature

Escherichia coli

Escherichia coli est un bacille Gram-négatif, anaérobie facultatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. *E. coli* fait partie de la flore intestinale normale des humains et des animaux. Ce micro-organisme pourrait bien être le plus versatile des pathogènes humains (Sousa, 2003). D'ailleurs, parmi tous les micro-organismes pathogènes causant de la diarrhée, les diverses souches de *E. coli* occupent une place prédominante (Law et Chart, 1998). Il s'agit d'un groupe hétérogène de micro-organismes possédant un large spectre d'interaction avec leur hôte (González *et al.* 1997). Bien que la majorité des souches d' *E. coli* font parti de la flore intestinale normale de leur hôte, dû à la présence de facteurs de virulence, certains types sont pathogènes. On classe les *E. coli* pathogènes en pathotypes, correspondant aux facteurs de virulence qu'ils possèdent. Les 6 pathotypes connus sont: *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* entéroagréatifs (EAEC), *E. coli* entéroinvasifs (EIEC) et les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) (Kaper *et al.* 2004). Ainsi, chaque pathotype possède la capacité de causer des symptômes cliniques aux caractéristiques pathologiques et épidémiologiques distinctes (Robins-Browne *et al.* 2004). Les 3 symptômes cliniques les plus observés sont: les maladies entériques/diarrhée, l'infection du tractus urinaire et les septicémies/méningites (Bekal *et al.* 2003).

Les EAEC

Les EAEC ont un motif d'adhérence, mannose-résistant, aux cellules épithéliales humaines (HEp-2) avec un motif "auto-agrégatif" et ne produisent pas de toxine

labile (LT) ou stable (ST) à la chaleur (Kaper *et al.* 2004 et Savarino *et al.* 1993). Cette définition s'applique autant aux souches pathogènes qu'aux souches non-pathogènes (Nataro *et al.* 1998). L'observation du motif d'adhérence aux cellules Hep-2 et l'utilisation de sondes oligonucléotidiques spécifiques demeurent les méthodes d'identification des EAEC les plus courantes (Rich *et al.* 1999). Les diverses souches EAEC diffèrent au niveau de leur pathogénicité. La pathophysiologie des diarrhées à EAEC ainsi que les marqueurs de virulence permettant à ces bactéries de causer la diarrhée sont peu connus (Jiang *et al.* 2002). Des études cliniques, à l'aide de modèles animaux et de volontaires, semblent indiquer que les EAEC endommagent la muqueuse intestinale. (Nataro *et al.* 1996). Les EAEC causent une diarrhée de type sécrétoire; c'est-à-dire que les selles des personnes atteintes sont aqueuses avec présence de mucus (Henderson *et al.* 1999 et Eslava *et al.* 1998). La première étape de la pathogenèse des EAEC est l'adhérence agrégative à la muqueuse intestinale (Kaper *et al.* 2004). La plupart des souches EAEC possèdent le plasmide *pAA* encodant plusieurs facteurs de virulence associés aux EAEC dont les « aggregative adherence fimbriae I et II » (AAFI/AAFII) qui sont les facteurs d'adhérence, les plus importants, associés aux EAEC (Okeke *et al.* 2000 et Zamboni *et al.* 2004). Dans une étude de Zamboni *et al.* (2004), les auteurs ont utilisé la sonde ADN CVD432 aussi nommée sonde EAEC, correspondant à un fragment de 1Kb de *pAA*, cela permet d'identifier deux sous-populations de EAEC virulents; la première, positive lors de l'hybridation avec la sonde CVD432, possédant le gène *aap* qui code pour la dispersin et la deuxième, négative lors de l'hybridation avec CVD432, qui possède les gènes *astA* pour « enteroaggregative E. coli heat-stable toxin » encodant la toxine EAST1 pour « enteroaggregative E. coli heat-stable

toxin 1 » et *shf* codant la protéine Shf « cryptic secreted protein ». Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Elias *et al.* (2002) lors d'une étude de souches EAEC provenant d'enfants souffrant, ou non, de diarrhée. Plusieurs études ont associé le plasmide *pAA* aux EAEC, mais aucune n'a pu associer la présence du plasmide avec l'apparition de maladie (Okeke *et al.* 2000). Il a cependant été démontré que la présence du plasmide *AA2* (*pAA2*) de O42 est nécessaire pour l'induction d'effets toxiques (Henderson *et al.* 1999). Le plasmide *pAA2* encode, entre autre, les toxines EAST1 et Pet (Plasmid- encoded toxin) ainsi que le fimbriae AAFII (Elias *et al.* 1999).

Par contre, il semble qu'aucun facteur de virulence n'est présent chez tous les EAEC (Bouzari *et al.* 2001 et Ménard et Dubreuil, 2002). Des études, menées à l'aide de volontaires, permettent de croire que la virulence des souches EAEC humaines est hétérogène sur les plans phénotypique et génétique (Czeczulin *et al.* 1999). Ceci laisse croire que les EAEC représentent un groupe hétérogène, comptant plusieurs sérotypes et une grande variété de facteur de virulence (Elias *et al.* 2002 et Law et Chart, 1998). Les fimbriae AAFI et AAFII sont différents sur les plans morphologique et génétique, mais sont impliqués dans le phénotype d'adhérence observé chez les EAEC (Ménard et Dubreuil, 2002). Parmi les autres facteurs de virulence des EAEC notons la cytotoxine Pet, des hémolysines, diverses protéines de la membrane externe et plusieurs entérotoxines dont EAST1. La fonction principale des toxines et autres facteurs de virulence est de permettre l'accès, aux micro-organismes qui les produisent, à divers environnements chez l'hôte ainsi qu'aux nutriments qui y sont présents, en les rendant disponibles pour le pathogène (Sousa, 2003). Les étapes majeures de l'infection due aux EAEC semblent être la

colonisation des muqueuses intestinales, particulièrement au niveau du côlon, puis la production d'entérotoxines (LT et/ou EAST1) et de cytokines (Kaper *et al.* 2004 et Navarro-García *et al.* 1998). La formation d'un biofilm dense pourrait contribuer à la capacité des EAEC à causer des diarrhées persistantes (Nataro *et al.* 1998). De plus, la sécrétion de mucus peut être exploitée par les EAEC, puisque leurs fimbriae leur permettent d'y adhérer. En colonisant le mucus les EAEC peuvent éviter les défenses de l'hôte, ce qui leur permet par la suite de proliférer et de produire une plus grande quantité de toxine à court terme (Law et Chart, 1998). La dernière étape est une toxicité au niveau de la muqueuse, se traduisant par l'exfoliation des cellules épithéliales intestinales (Henderson *et al.* 1999). À cause du court temps d'incubation observé chez des volontaires, par Nataro *et al.* (1995) l'implication du petit intestin dans l'établissement de l'infection aux EAEC ne peut être écarté. De plus, les hôtes souffrant de malnutrition sont plus enclins à développer des symptômes de diarrhée persistante puisque leur capacité à réparer les muqueuses intestinales est diminuée (Nataro *et al.* 1998). Il est à noter que la présence des EAEC a été observée dans plusieurs régions du monde tel que l'Amérique du Sud, l'Asie du Sud-Ouest, l'Inde, le Mexique et le Royaume-Uni (Schultsz *et al.* 2000 ; Henderson *et al.* 1999 ; Itoh *et al.* 1997 et Smith *et al.* 1997).

Épidémiologie des EAEC

Les EAEC furent d'abord associés à des symptômes de diarrhée persistante (plus de 14 jours), mais sont maintenant reconnus comme agents étiologiques de diarrhée aiguë et persistante (Okeke *et al.* 2000 et Huang *et al.* 2004). Les EAEC sont donc considérés comme étant d'importants pathogènes entériques associés à des cas de

diarrhée et d'empoisonnement alimentaire (Tsai *et al.* 2003). Ils sont mis en cause dans des cas de diarrhée chez les touristes (tourista), les enfants des pays en voie de développement et les patients HIV-positifs (Huang *et al.* 2004 et Germani *et al.* 1998). De plus, le nombre d'épisode de diarrhée relié aux EAEC est en hausse autant dans les pays en développement que dans les pays industrialisés tel que les États-Unis (Huang *et al.* 2004). Lors d'une étude portant sur la diarrhée du voyageur, des souches EAEC furent isolées de 23 des 165 échantillons de selles provenant de patients ayant de la diarrhée, alors que pour le même nombre d'individus n'ayant aucun symptôme de diarrhée, seulement 4 souches EAEC furent isolées (Vila *et al.* 2000). Les caractéristiques de transmission des EAEC ne sont pas entièrement connues. Il est difficile de comprendre pourquoi les EAEC sont associés à des symptômes de diarrhée, dans certaines études épidémiologiques, alors que d'autres études n'observent aucune association (Okeke *et al.* 2000). Ces observations pourraient être expliquées par l'hétérogénéité des facteurs de virulence des EAEC et le fait que des souches plus virulentes pourraient être associées à certaines régions géographiques ou populations (Okeke *et al.* 2000). Une autre hypothèse est l'excrétion d'EAEC dans les fèces de patients longtemps après un épisode de diarrhée, ce qui explique la détection de souche EAEC dans les selles de sujets sains (Gascón *et al.* 2000). Le fait que des volontaires sains, ayant ingurgité un bouillon de EAEC, aient été colonisés sans développer de symptôme de diarrhée semble indiquer que les EAEC seraient surtout des opportunistes ayant comme cible les enfants et les patients immunodéficients (Wanke *et al.* 1998). Une étude de Wanke *et al.* (1998), a permis la comparaison de la présence de souches EAEC dans les selles de patients avec et sans symptômes de diarrhée par rapport à la présence des EAEC dans les selles de patients

infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) avec et sans symptôme de diarrhée. Leurs résultats permettent d'observer une présence significativement plus élevée des EAEC dans les selles de patients, infectés ou non par le VIH, souffrant de diarrhée. En effet, chez les sujets VIH-négatifs souffrant de diarrhée, Wanke *et al.* (1998) ont isolé des souches EAEC dans 28% (19/68) des cas, alors que pour les témoins, n'ayant pas de diarrhée, le taux d'isolement des EAEC était de 13% (7/52). Chez les sujets VIH-positifs, des souches EAEC ont été isolées chez 44% (30/68) des patients souffrant de diarrhée, alors que chez les témoins la présence des EAEC était de 27% (18/66). Cette étude de Wanke *et al.* (1998) appuie l'hypothèse selon laquelle les EAEC agiraient, en premier, en tant qu'agents opportunistes (Wanke *et al.* 1998).

Les EAEC seraient aussi à l'origine d'intoxications alimentaires et les facteurs de risque associés au développement d'infection aux EAEC impliqueraient, entre autre, la réfrigération inadéquate de la nourriture (Huang *et al.* 2004). Les EAEC ont été isolés de nourriture pour enfant, biberons pour bébé, de lait et d'eau (Tsai *et al.* 2003). Une étude de Nataro *et al.* (1995), effectuée avec l'aide de volontaires adultes, a permis de déterminer la dose infectieuse des EAEC, par voie orale, de l'ordre de 10^{10} CFU avec un temps d'incubation variant de 8 à 18h.

EAST1 (généralités)

Le fait de ne pas connaître les causes de l'entérototoxicité des EAEC a poussé plusieurs équipes à la recherche d'entérotoxines chez les EAEC (Henderson *et al.* 1999). La toxine EAST1 fut mise en évidence pour la première fois à partir de la souche EAEC 17-2 (O3:H2) isolée des selles d'un enfant Chilien souffrant de diarrhée (Savarino *et al.* 1991 et Nataro *et al.* 1993). La toxine EAST1 est produite par la

moitié des souches EAEC et est bien répandue chez les souches d' *E. coli* causant la diarrhée (Zhou *et al.* 2002 et Yamamoto et Taneike 2000). Diverses études ont associé EAST1 à des pathotypes autres que les EAEC tel que les EHEC, les ETEC, DAEC, les « shiga toxin-producing » *E. coli* (STEC) et les « verotoxin-producing » *E. coli* (VTEC), ainsi qu'aux genres bactériens *Salmonella* et *Klebsiella* (Yamamoto *et al.* 1996; Morabito *et al.* 1998; Stephan *et al.* 1999; Paiva de Sousa et Dubreuil, 2001; Nguyen Thi *et al.* 2003; Blanco *et al.* 2005 et Lopes *et al.* 2005). Savarino *et al.* (1996) ont observé le gène *astA* chez 100% des souches EHEC O157:H7, 41% des ETEC et 22% des EPEC testées. De plus, ils ont détecté le gène *astA* chez 38% des souches provenant de selles d'enfants asymptomatiques. Le gène *astA* est associé à des souches d' *E. coli* d'origine humaine et animale (Vu-Khac *et al.* 2004). De plus, des études confirment une forte association entre le gène *astA* et différents facteurs de colonisation humains chez des souches ETEC (Osek, 2003). Un variant du gène *astA* a été isolé de la souche EAEC O42 (produisant AAF/II, EAST1 et Pet) et semble plus virulent que la toxine d'origine 17-2 lorsque administrée à des volontaires (Nataro *et al.* 1995 et 1998). Pour cette raison, il est possible que la toxine EAST1 provenant de la souche 17-2 soit, en fait, un variant ayant une toxicité altérée. La toxine EAST1 semble contribuer à l'induction de diarrhée lors d'infection dû aux EAEC, mais la présence du gène *astA* chez des souches commensales de *E. coli* "brouille les cartes" en ce qui concerne le véritable rôle de EAST1 dans la pathogénèse des EAEC (Ménard et Dubreuil, 2002). Rich *et al.* (1999) ont observé la présence du gène *astA* chez 40% (18/40) des souches EAEC, provenant de selles d'enfants (> 7ans) souffrant de diarrhée. Par contre, ils n'ont pu établir aucune corrélation entre la présence de *astA* et la sévérité de la diarrhée. Il faut noter que cette situation n'est pas

inhabituelle. Bien que plusieurs micro-organismes sécrètent des toxines, capables d'induire des dommages chez l'hôte, peu d'expérimentation ont réussi à prouver, ou à déterminer, l'influence d'une toxine sur la pathogénicité d'un micro-organisme exception faite des toxines très potentes tel que les toxines tétanique et botulique (Sousa, 2003). Lors d'une étude portant sur des souches DAEC isolées de selles d'enfants Brésiliens, Lopes *et al.* (2005), ont détecté le gènes *astA* plus fréquemment chez des souches provenant de patients (18%) souffrant de diarrhée que chez les souches provenant de d'individus sains (12%). Lors d'épisodes de diarrhée, impliquant plusieurs personnes, des souches possédant le gène *astA*, seul ou en association avec d'autres facteurs de virulence, ont été mise en évidence (Toshima *et al.* 2004, Hedberg *et al.* 1997). Par contre, une souche d' *E. coli* EAST1-positive n'a induit aucune diarrhée lorsque administrée à des porcelets nouveaux-nés privés de colostrum (Ngeleka *et al.* 2003). Il est concevable qu'aucune pathogénicité ne soit observée pour une souche ne possédant pas les facteurs d'adhérence nécessaire à la colonisation de l'intestin. Lorsque testé à l'aide du model des chambres de Ussing, la toxine EAST1 induit une augmentation du courant électrique démontrant ainsi sa capacité à induire la diarrhée (Zhou *et al.* 2002).

Structure de EAST1

La toxine EAST1 est un peptide de 38 acides aminés ayant un poids moléculaire de 4.1kDa et un point isolélectrique (pI) calculé de 9.25. La toxine EAST1 est encodée par un cadre de lecture ouvert de 117pb nommé *astA* (Ménard et Dubreuil, 2002). Le gène *astA* peut être retrouvé sous forme chromosomique et/ou plasmidique en une ou plusieurs copies chez les bactéries. Une étude de Morabito *et al.* (1998),

utilisant les techniques d'hybridation et de PCR, suggèrent qu'il y aurait un certain degré de variabilité dans la séquence nucléotidique du gène *astA*, parmi les différents groupes de *E. coli*. EAST1 possède quatre cystéines qui sont impliquées dans la formation de deux ponts disulfures. Une étude de spectrométrie de masse a permis de déterminer que les deux ponts disulfures ont une conformation C1-C2 et C3-C4 (Ménard *et al.* 2004). Le pont disulfure entre les cystéines en position 17 et 27 semble être impliqué dans la toxicité, puisque la mutation de la cystéine 17 par une alanine entraîne la perte de l'entérototoxicité (Fasano 1999). De plus, en utilisant un peptide de synthèse, correspondant aux acides aminés 8 à 29 de la toxine EAST1, Savarino *et al.* (1993) ont observé une réponse toxique, en utilisant les chambres de Ussing (Voir Tableau I p.32). La toxine EAST1 est structurellement et fonctionnellement semblable à la guanyline, une hormone endogène de l'humain. Tout comme la guanyline, EAST1 contient quatre cystéines impliquées, avec la même conformation, dans la formation de ponts disulfures essentiels à l'activité biologique (Ménard et Dubreuil, 2002) (Voir Tableau I p.32). Une étude de Savarino *et al.* (1996) a permis d'évaluer que le gène *astA* est chromosomique chez les EHEC (présent chez 100% des 75 EHEC O157:H7) et plasmidique chez 41% des 149 ETEC, 22% des 65 EPEC et 41% des 227 EAEC (Savarino *et al.* 1996 et Fasano, 1999). Ces observations suggèrent que le gène de EAST1 fût acquis par les premières générations d'EHEC O157:H7 et qu'une certaine sélection s'effectue grâce à sa conservation au sein du bagage génétique (Fasano, 1999). De plus, il est tentant d'émettre l'hypothèse que la transfection d'une souche EHEC par un bactériophage serait responsable de la présence du gène *astA*, sous forme plasmidique, chez les autres pathotypes d' *E. coli* (Fasano, 1999). Bacciu *et al.* (2004) ont identifié la séquence d'insertion IS1414,

contenant le gène *astA*, chez des souche de *S. enterica* serovar Abortusovis. IS1414 ayant déjà été identifié chez une souche ETEC, il s'agirait d'une preuve de la possibilité de transfert horizontal de *astA* entre des souches de genres différents (Baccius *et al.* 2004). Aussi, une séquence homologue au gène *astA* a été découverte, à l'intérieur de la séquence d'insertion IS285, chez *Yersinia pestis* (Yamamoto et Taneike 2000). Dans le cadre de l'étude de Savarino *et al.* (1996), aucune hybridation avec la sonde ADN EAST1 n'a été observée chez les 55 souches EIEC, les 22 souches de *Yersinia enterocolitica* et les 20 souches de *Vibrio cholerae* non-O1 testées. Une étude de Paiva de Sousa et Dubreuil (2001) utilisant les techniques de PCR et d'hybridation pour tester 345 souches de la famille des *Enterobacteriaceae* incluant les genres : *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Edwardsiella*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella*, *Citrobacter* et *Enterobacter*, a permis de détecter le gène *astA* chez 28.3% et 11.9% des échantillons d' *E. coli* et de *Salmonella spp.* respectivement, mais dans aucun des échantillons des autres genres bactériens analysés (Sousa, 2003). De plus, dans cette même étude, le gène *astA* fut détecté chez 16.6% des échantillons de *E. coli* ne possédant aucun autre gène de virulence testé et chez des souches EIEC, contrairement aux observations de Savarino *et al.* (1996) (Paiva de Sousa et Dubreuil, 2001).

Variants de EAST1

La séquence du gène *astA*, encodant la toxine EAST1 de la souche EAEC O42 (O44:H18), est largement distribuée chez les souches d' *E. coli* responsables de diarrhée. Un autre variant, produit par la souche EAEC 17-2 (O3:H2), est connu et diffère d'une base au codon 21 (ACA → GCA) entraînant une substitution de la

thréonine par une alanine (Ménard et Dubreuil 2002; Yamamoto *et al.* 1997). Dans le cadre d'une étude effectuée à l'aide de volontaires, la toxine EAST1 O42 a induit des symptômes de diarrhée chez trois des quatre volontaires inoculés alors qu'aucune diarrhée ne fût observée pour la toxine EAST1 17-2 (Nataro *et al.* 1995 et Yamamoto et Taneike 2000). Yamamoto *et al.* ont décrit, en 1997, un variant de EAST1 isolé d'une souche d' *E. coli* qu'ils nommèrent « EPEC-related *E. coli* ». Ce variant possède deux modifications: la première au codon 20 (TGC → TAC) induisant la modification d'acide aminé (Cys → Tyr) et la deuxième au codon 33 (AAG → GAG) menant au changement d'acide aminé (Lys → Glu) (Yamamoto *et al.* 1997). Il est possible que le changement d'acide aminé au codon 20 ait un effet sur l'entérototoxicité du variant puisqu'il empêche la formation d'un pont disulfure (Voir Tableau II p.33). Zhou *et al.* (2002) ont rapporté deux variants du gène *astA*, un plasmidique et l'autre chromosomique, provenant de la souche *E. coli* 96-127-23 (O166:H15) isolée lors d'un épisode de gastro-entérite au Japon en 1996. Le variant chromosomique diffère du gène *astA* O42 par trois codons soit: codon 20 (TGC (Cys) → CGC (Arg)), au codon 26 (TCG (Ser) → TCA (Ser)) et au codon 34 (CCG (Pro) → CAG (Gln)). Quant au variant plasmidique on remarque des changements aux codons 30 (AGG (Arg) → GGG (Glu)) et 34 (CCG (Pro) → CAG (Gln)) (Zhou *et al.* 2002). Lai *et al.* (1999), ont effectué des tests de PCR, pour détecter la présence du gène *astA*, chez les souches d' *E. coli* de la collection ECOR. ECOR comprend 72 souches sauvages d'origine humaine et 16 souches sauvages isolées d'autres espèces de mammifères. Cette collection est considérée comme représentative des variations génotypiques de *E. coli*. Parmi les 88 souches testées (ECOR 1 à ECOR 88), trois (ECOR 5, 43 et 44) possédaient un gène *astA* identique à celui de la souche EAEC O42. Les souches

ECOR 10 et 44 possédaient une séquence de *astA* semblable à O42 avec un changement de base au codon 23 (GCG → GCC), n'entraînant pas de changement de la séquence protéique. La séquence *astA* de la souche ECOR 33 diffère de la séquence O42 par trois changements de base respectivement aux codons huit (CGG (Ala) → CGA (Ala)), neuf (AGA (Arg) → AGG (Arg)) et 11 (GCA (Ala) → ACA (Thr)), donc se traduisant par un changement unique d'acide aminé au codon 11 (Voir Tableau II p. 33). Les mêmes variations (codons huit, neuf et 11) furent observées chez les souches ECOR 32 et ECOR 35 avec, en plus, deux autres changements de base au codon 23 (GCG (Ala) → GTC (Val)) (Lai *et al.* 1999). Il est intéressant d'observer que les variations de base se trouvent toutes dans la zone essentielle à l'entérotoxicité, soit le domaine fonctionnel de EAST1, correspondant aux acides aminés 8 à 29 de la séquence protéique de EAST1. Cette observation est intéressante sachant que les souches de la collection ECOR sont reconnues comme étant non-pathogènes (Voir Tableau II p.33) (Lai *et al.* 1999). Il serait intéressant d'effectuer des tests de toxicité sur ces variants de EAST1, puisque les modifications observées touchent des acides aminés généralement importants (EPEC-related *E. coli* et souches 96-127-23) tels que les cystéines (ponts disulfures) et les prolines (structure de la toxine) et une zone (acide aminée 8 à 29) que Savarino *et al.* (1993) avaient décrit comme suffisante pour observer une activité entérotoxique dans le modèle des chambres de Ussing.

Comparaison de EAST1 avec STa

EAST1 est souvent comparée à STa, une autre entérotoxine, stable à la chaleur, produite par *E. coli*. La toxine STa est reconnue pour causer une diarrhée de type

sécrétoire (Greenberg *et al.* 1997). Les deux toxines sont semblables sur les plans structurel et fonctionnel, c'est-à-dire qu'elles sont de faibles poids moléculaires et possèdent plus d'un pont disulfure, bien que EAST1 ne possède que quatre cystéines par rapport à six pour la toxine STa (Nataro *et al.* 1998). Une homologie de 50% est observée entre la séquence de EAST1 et le domaine entérotoxique de STa correspondant aux acides aminés 6 à 18 (Savarino *et al.* 1993). De plus, STa et EAST1 activent la guanylate cyclase-C (GC-C) au niveau des cellules épithéliales intestinales et donc, induisent la production de guanosine monophosphate cyclique (GMPc) (Osek, 2003 et Greenberg *et al.* 1997). Cependant, EAST1 et STa sont différentes sur le plan immunologique puisque aucune neutralisation croisée, de EAST1, n'a été observée lors de l'utilisation d'anticorps polyclonaux dirigés contre STa en chambres de Ussing (Savarino *et al.* 1991). Aussi, contrairement à STa, aucun peptide signal classique n'est observée à l'extrémité N-terminal de la séquence protéique de EAST1 (Ménard et Dubreuil, 2002).

Mécanisme d'induction de la diarrhée et récepteur de EAST1

Il est commun de croire, sans qu'il n'y ait de preuve directe, que EAST1 active la GC-C au niveau des cellules épithéliales intestinales permettant la production de GMPc, comme le fait l'entérotoxine STa (Osek, 2003 et Greenberg *et al.* 1997). La GMPc est l'une des trois principales voies de communication intracellulaire, utilisées par les cellules intestinales, pour réguler le transport de l'eau et des électrolytes à travers la muqueuse intestinale (Fasano, 2002). L'augmentation de GMPc, dans l'intestin, entraîne une diminution de l'absorption de l'eau et des ions sodium en même temps qu'une augmentation de la sécrétion des ions chlore, menant ultimement à

l'apparition d'une diarrhée aqueuse (Currie *et al.* 1992). Selon Greenberg *et al.* (1997), STa agirait par mimétisme moléculaire de la guanyline, une hormone endogène de l'humain qui partage une homologie de 50% avec la toxine STa, sur le récepteur GC-C, induisant ainsi la diarrhée (Ménard et Dubreuil, 2002). La GC existe sous deux formes (particulaire et soluble) qui sont encodées par des gènes séparés. Dans l'intestin près de 80 % de la GC est particulaire et peut être activée, entre autre, par STa (Fasano, 1999). Des études utilisant des cellules T84 et COS transfectées avec GC-C indiquent une interaction de EAST1 avec la GC-C résultant en une augmentation de la concentration de GMPc (Fasano 2002). La toxine EAST1, tout comme STa, serait un agoniste de la GC dans ce système (Fasano 2002). En ce basant sur les études portant sur la GC et les similarités de séquences entre STa et EAST1, il est probable que EAST1 stimule la production de GMPc, via la GC particulaire, par stimulation du même récepteur que STa (Law et Chart 1998). Le Tableau I illustre bien les caractéristiques structurelles que partagent EAST1 et la guanyline. En effet, les deux peptides possèdent deux ponts disulfures de même conformation (C1-C2 et C3-C4). Cette observation renforce l'hypothèse d'un mécanisme d'action semblable pour EAST1 et la guanyline. D'autres micro-organismes entéropathogènes utilisent la voie de la GMPc lors de l'induction de diarrhée, par exemple les entérotoxines STI et STII de *Y. enterocolica*, l'entérotoxine de *Y. bercocieri*, l'entérotoxine de *K. pneumoniae* et l'entérotoxine, stable à la chaleur, de *V. cholerae* non-O1 (Fasano, 2002).

Épidémiologie de EAST1

Des épisodes de diarrhée impliquant des souches possédant le gène *astA* ont été décrits dans plusieurs régions du globe. L'épisode impliquant le plus grand nombre de personne, à ce jour, est survenu dans la ville de Tajimi au Japon en juin 1993. Des 6636 écoliers, provenant de 16 écoles élémentaires et du premier cycle du secondaire, ayant consommé un repas à la cafétéria, 2697 (40.6%) ont développé des symptômes de gastro-entérite. L'analyse des selles de 27 patients souffrant de diarrhée sévère a permis d'associer l'épisode à une souche EAEC (O?:H10) possédant le gène *astA* (Itoh *et al.* 1997). Un autre épisode de gastro-entérite causé par une souche de *E. coli* (O166:H15) a eu lieu en 1996 à Osaka au Japon. La souche de *E. coli* (O166:H15) ne possédait aucun facteur de virulence connu autre que *astA* (Zhou *et al.* 2002). Il a été suggéré que ce type d' *E. coli* représente un nouveau groupe d' *E. coli* entéropathogène ou un sous-groupe d' ETEC que l'on nomme EAST1EC (Toshima *et al.* 2004). Nishikawa *et al.* (2002) ont étudié les souches isolées des selles d'habitants de la ville d'Osaka souffrant de diarrhée, suite à cet épisode de gastro-entérite, entre 1997 et 2000. Ils concluent que les EAST1EC sont des pathogènes entériques potentiels, constituant 35% des *E. coli* causant de la diarrhée isolés lors de leur étude. Seules les EAST1EC possédant des facteurs de colonisation seraient pathogènes pour l'Homme, ce qui expliquerait que des EAST1EC, n'ayant pas de facteur de colonisation, soient retrouvés chez des hôtes sains (Nishikawa *et al.* 2002). Aussi Yatsuyanagi *et al.* (2003) ont isolé une souche EPEC, *astA*-positive, considérée comme étant l'agent étiologique d'un épisode de diarrhée au Japon. Les personnes atteintes étaient des étudiants et professeurs, d'une école secondaire, ayant consommé de l'eau contaminée. Une étude cas-contrôle de Vila *et al.* (1998) a permis d'associer des souches d' *E. coli*, possédant le gène *astA*, à des cas de diarrhée chez des enfants

en Espagne. Les souches *astA*- positives furent isolées de 19% (22/115) des enfants souffrant de diarrhée comparativement à 5% (4/79) pour les enfants sains. Sur le continent Américain, un épisode de diarrhée, impliquant plus d'une centaine d'adultes aux États-Unis, a permis d'isoler un souche atypique d' *E. coli* (O39:NM). Cette souche possédait les gènes *astA* et *eae* encodant une intimine responsable pour des lésions d'attachement et effacement. L'activité de ces gènes a été évaluée à l'aide de test de fonctionnalité. Une activité entérotoxique pour *astA*, (la souche ne possédant pas les gènes encodant pour les toxines LT, STa, STb, Stx1 et Stx2), a été observée à l'aide de chambres de Ussing (Hedberg *et al.* 1997). Une étude de Zamboni *et al.* (2004), portant sur la caractérisation de souches EAEC isolées des selles d'enfants Brésiliens souffrant de diarrhée, a permis de noter une plus forte présence (61%) du gène *astA* chez des souches EAEC n'hybridant pas avec la sonde ADN CDV432 qui est spécifique aux EAEC. De plus, le gène *astA* fut détecté plus souvent dans les échantillons de selles provenant de cas de diarrhée que de cas de témoins sains et ce dans les 2 groupes de EAEC étudiés, c'est-à-dire les EAEC hybridant avec la sonde CVD432 et ceux négatifs pour l'hybridation.

Une étude de Piva *et al.* (2003) a permis de démontrer que chez des souches EAEC *pAA*⁺, la fréquence de détection du gène *astA* était semblable chez les adultes et les enfants.

Stephan *et al.* (2004) ont observé que 10 des 11 souches EPEC O157:H45, isolées de bovins sains, possédaient le gène *astA*. Des souches EPEC O157:H45 ont déjà été associées avec de la diarrhée chez l'humain et un épisode important a été décrit au Japon en 1998 (Stephan *et al.* 2004 et Makino *et al.* 1999). De plus, dans cette même étude, les auteurs concluent que les bovins peuvent être un réservoir de souches

EPEC O157:H45 et pourraient jouer un rôle dans les maladies d'origine alimentaire chez l'humain (Stephan *et al.* 2004).

Des souches de *E. coli* possédant le gène *astA* encodant la toxine EAST1 sont aussi isolées d'hôtes bovins, porcins et caprins (Veilleux et Dubreuil, 2006; Han *et al.* 2002; Cookson *et al.* 2002 et Frydendahl *et al.* 2001).

Veillez prendre note que l'aspect épidémiologique des souches exprimant le gène *astA* chez les animaux (porcin, bovin et caprin) est discuté dans la revue de littérature intitulée: Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals (Veilleux et Dubreuil, 2006).

L'association de EAST1 avec les facteurs d'adhérence F4 et CS31A

Plusieurs études, portant sur des souches bactériennes isolées d'hôtes porcins et/ou bovins souffrant de diarrhée et/ou de maladies de l'oedème, révèlent une très forte association entre le gène *astA* et divers facteurs de virulence. Parmi ceux-ci, on retrouve le fimbriae F4 (K88) qui permet l'adhérence des bactéries aux cellules intestinales. Cette adhérence permet l'établissement de l'infection en prévenant l'élimination des bactéries par le péristaltisme intestinal (Francis *et al.* 1998). On observe que les souches F4-positives sont souvent *astA*-positives et ce dans diverses régions géographiques tels que la Slovaquie et la Pologne. (Vu-Khac *et al.* 2004; Berberov *et al.* 2004; Osek, 2003). Chez le porc, les infections les plus communes et les plus sévères sont causées par des souches ETEC exprimant le fimbriae F4 (Berberov *et al.* 2004). Les gènes encodant la toxine EAST1 et le facteur d'adhérence F4 seraient situés sur des plasmides différents (Osek, 2003). Noamani *et al.* (2003)

ont aussi observé 100 % d'association entre *astA* et l'antigène K88ac chez des souches ETEC isolées lors d'un épisode de diarrhée chez des porcs.

Chez le bovin, l'adhésine CS31A est similaire au facteur d'adhérence F4 (K88) exprimé par les souches ETEC porcines et permettant l'adhérence à un récepteur présent chez les cellules intestinales embryonnaires humaines Int-407. Une étude de Bertin *et al.* (1998) sur l'association entre l'antigène CS31A et la toxine EAST1, chez des souches produisant la toxine cytotoxique nécrosante (*cytotoxic necrotizing factor* type 1 (CNF1)) isolée de veaux souffrant de septicémie et de diarrhée, a permis d'observer une forte association entre le gène CS31A (*clpG*) et le gène *astA*. De plus, une étude de Di Martino *et al.* (1995) a permis d'établir que les gènes encodant les adhésines CS31A-L et CF29K étaient identiques sur le plan structurel. L'adhésine CS31A-L est retrouvée principalement chez les souches *E. coli* isolées d'humain alors que CF29K est isolée de souches *K. pneumoniae* impliquées dans des cas d'infections nosocomiales. Cette même association fût observée par Toshima *et al.* (2004) chez des souches EAST1EC provenant de nourriture contaminée. Girardeau *et al.* (2003) ont observé une forte prévalence (32/77), du gène *astA* lors de la caractérisation de souche *afa-8*, principalement pour les isolats associés à une bactériémie. L'opéron *afa-8* est commun chez les souches d' *E. coli* pathogènes isolées d'humains et d'animaux. Cette étude souligne la prévalence significative de *astA* chez des isolats extraintestinaux étant *afa-8*- positifs.

Veillez prendre note que l'association entre le gène *astA* et des facteurs d'adhérence est discutée plus en profondeur dans la revue de littérature intitulée: Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals (Veilleux et Dubreuil, 2006).

Tests de toxicité

Peu d'études font mention de la détermination de la toxicité pour EAST1. En effet, la plupart des études détectent, par PCR, le gène *astA* chez des souches d' *E. coli*. Par contre, la détection d'un gène chez une souche bactérienne ne garantit en rien la production et la sécrétion d'une protéine complète, fonctionnelle et en quantité suffisante pour causer des symptômes chez l'hôte. Dans le cas de EAST1, les tests de toxicité répertoriés dans la littérature ont été effectués en utilisant des filtrats de surnageant de bactéries produisant la toxine, puisque la purification à homogénéité de EAST1 est récente (Savarino *et al.* 1996 et 1991 ; Nataro *et al.* 1995 et Ménard *et al.* 2004). Cependant, puisque le gène *astA* peut-être sous forme chromosomique et/ou plasmidique en une ou plusieurs copies, l'utilisation de surnageant de culture bactérienne ne tient pas compte des quantités de toxine testées, à moins d'avoir une méthode efficace pour doser la toxine, ce qui n'a jamais été publié à notre connaissance. De plus, une activité entérotoxique a été observée, pour une souche DAEC ne possédant pas le gène *astA*, en utilisant du surnageant bactérien ultracentrifugé comme échantillon pour le test d'anses ligaturées de lapin et un test de cytoxicité sur une monocouche de cellules Y1 (Sousa, 2003). Cette observation souligne le fait que l'ultracentrifugation seule peut ne pas être suffisante pour obtenir un échantillon pur.

Des études ont tenté de démontrer l'entérotoxicité de EAST1 par gavage de souriceaux (suckling mouse assay), la méthode de référence pour la toxine STa (Giannella, 1976). Greenberg *et al.* (1997) ont observé une accumulation de fluides dans l'intestin induite par la toxine STa, à l'aide de ce test. Savarino *et al.* (1991) ont

tenté de déterminer la toxicité de EAST1 à l'aide de ce test en utilisant une fraction de surnageant de culture de *E. coli* 17-2 de poids moléculaire se situant entre deux et cinq kDa. La même méthodologie fut utilisée, i.e le modèle des souriceaux, par Ménard *et al.* 2004 en utilisant de la toxine EAST1 17-2 purifiée à homogénéité. En utilisant des souriceaux CD-1 aucune entérotoxicité ne fut observée lors de ces études. Par contre, la méthodologie utilisée par Savarino *et al.* (1991) et celle décrite par Giannella (1976) pour l'étude des entérotoxines de *E. coli*, dont STa diffèrent. Giannella (1976) et Dean *et al.* (1972) séparent les souriceaux de leurs mères juste avant l'expérimentation ce qui permet aux souriceaux de boire, *ad libitum*, du colostrum. Selon Dean *et al.* (1972), chez les souriceaux n'ayant pas consommé de colostrum avant l'expérimentation, pour STa, STb et LT, on observait des résultats inconcistants. Or, lors de leurs expérimentations Savarino *et al.* (1991) séparaient les souriceaux de leurs mères de trois à cinq heures avant l'expérimentation. De plus, ni Savarino *et al.* (1991) ni Ménard *et al.* (2004) ne font mention du nombre de souriceaux utilisés, on peut donc se demander si les résultats observés sont statistiquement valables. L'entérotoxicité de EAST1 devrait être déterminée en utilisant la même méthodologie utilisée par Giannella (1976) pour STa. D'autant plus que dans la même étude, Savarino *et al.* (1991) ont observé une activité toxique pour la fraction de deux à cinq kDa en utilisant le modèle des chambres de Ussing.

Les chambres de Ussing n'ont, à notre connaissance, jamais été utilisées pour tester l'entérotoxicité de EAST1 purifiée. Cette technique possède, entre autres, l'avantage de permettre de tester différents types de tissus provenant de divers modèles animaux ou de cellules en culture. Lors de deux expériences, Savarino *et al.* (1991 et 1996) ont utilisé des segments de petit intestin prélevés de lapin mâle New

Zeland White ayant un poids de deux à trois kilogrammes. Dans les deux cas, une réponse entérotoxique fut observée pour EAST1 17-2, ce qui permet de croire que d'autres variants de EAST1, tel que EAST1 O42, pourraient être étudiés à l'aide des chambres de Ussing. Aussi, l'activité entérotoxique de EAST1, provenant d'une souche de *Salmonella typhimurium* AGONA, fut observée à l'aide des chambres de Ussing en utilisant un filtrat de culture bactérienne (Paiva de Sousa et Dubreuil, 2001).

Une autre méthode *in vitro*, le "*suckling mouse intestinal loop assay*", utilisée pour la toxine STa, pourrait être envisagée lors de l'étude de EAST1. Par cette méthode, les échantillons sont injectés directement dans des segments d'intestin de souriceaux. L'avantage de ce test est l'absence de passage de l'échantillon dans l'estomac où plusieurs protéases sont présentes; le risque de protéolyse de l'échantillon, qui pourrait altérer l'entérotoxicité, est ainsi diminué (Greenberg *et al.* 1997).

De plus, dans le cas où les souriceaux ne seraient pas un bon modèle animal pour EAST1, d'autres animaux tel que le rat et le lapin pourraient être utilisés lors de tests utilisant des anses ligaturées d'intestin. Lors d'une étude de Monteiro-Neto *et al.* (1997), aucune accumulation de fluide n'a été observée dans des anses ligaturés d'iléum de rats en utilisant le surnageant de souches (O111:H12) EAST1-positives. Ceci peut être expliqué de différentes manières: 1) il est possible que les souches ne produisaient pas, ou en très faible quantité, la toxine, 2) EAST1 n'est pas active dans l'iléum et 3) le rat n'est pas un modèle adéquat pour l'étude de EAST1. Quoiqu'il en soit, l'utilisation de surnageant de culture bactérienne rend difficile le contrôle de la quantité de toxine inoculée. L'utilisation de toxine purifiée facilite la standardisation des quantités de toxine testées. De plus une étude de Whipp (1990), portant sur

l'entérotoxine d' *E. coli* STb, illustre bien qu'il est nécessaire de tester plusieurs modèles animaux pour une même méthode. En effet, pour une même méthode utilisant des anses ligaturées d'intestin, on observe une réponse plus faible chez les souriceaux que chez les rats et les porcs.

EAST1 O42 : met pro ser thr gln tyr ile arg arg pro
¹ATG CCA TCA ACA CAG TAT ATC CGG AGG CCC

EAST1 17-2 : **■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■**
 ala ser ser tyr ala ser cys ile trp cys
³¹GCA TCC AGT TAT GCA TCG TGC ATA TGG TGC
■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■
thr thr ala cys ala ser cys his gly arg
⁶¹GCA ACA GCC TGC GCT TCG TGT CAT GGA AGG
A■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■
ala
 thr thr lys pro ser leu ala thr stop
⁹¹ACT ACA AAG CCG TCA CTC GCG ACC TGA¹¹⁷
■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■ ■■■

Figure 1. Comparaison des séquences nucléotidique et protéique des variants O42 et 17-2 de la toxine EAST1. Le caractère (■) indique que les séquences nucléotidique et protéique sont identiques pour les deux variants.

Protéines	Séquences protéiques	Nombre d'acides aminés	Références
EAST1 O42	MPSTQYIRRPASSYASCIWCATACASCHGRTTKPSLAT	38	Savarino <i>et al.</i> (1993)
EAST1 17-2	MPSTQYIRRPASSYASCIWCTTACASCHGRTTKPSLAT	38	Yamamoto <i>et al.</i> (1997)
STa humain	NSSNYCC ELCCNPACTG CCY	19	Aimoto <i>et al.</i> (1982)
STa porcine	NTFYCC ELCCNPACTG CCY	18	Takao <i>et al.</i> (1983)
Guanyline humaine	PGTCEICAYAACTGC	15	Greenberg <i>et al.</i> (1997)

Tableau I. Comparaison des séquences protéiques des toxines EAST1 O42, EAST1 17-2, STa (humain), STa (porcin) et de la guanyline humaine. Les séquences conservées, entre les cinq molécules, sont soulignées. Le motif commun aux cinq molécules (petit a. a non-polaire, alanine, cystéine, petit a. a non-polaire, petit a. a non-polaire, cystéine) est représenté en gras (Ménard et Dubreuil, 2002). Les séquences en bleu correspondent au domaine toxique (acides aminés 6 à 18) de la toxine STa. Les séquences en rouge, correspondent aux acides aminés 8 à 29 de la toxine EAST1, et est entérototoxique dans le modèle des chambres de Ussing (Savarino *et al.* 1993). Les positions des ponts disulfure, pour chaque protéine, sont indiquées par les flèches reliant les cystéines. Pour la toxine EAST1 17-2 les ponts disulfures sont en position Cys17-Cys20 et Cys24-Cys27, pour STa les positions sont : Cys6-Cys11, Cys7-Cys15 et Cys10-Cys18. Finalement les ponts disulfure de la guanyline sont en position Cys4-Cys7 et Cys12-Cys15 (Fasano 1999). Aucune étude n'a été effectuée pour déterminer la position des ponts disulfures de EAST1 O42, mais on peut penser que la conformation peut être identique, sinon similaire, au variant 17-2.

Variant	Séquence	Références
<i>E. coli</i> O42	MPSTQYIRRPASSYASCIWCATACASCHGR ^T TKP ^S LAT	Ménard et Dubreuil, 2002
<i>E. coli</i> 17-2	MPSTQYIRRPASSYASCIWC ^T ITACASCHGR ^T TKP ^S LAT	Ménard et Dubreuil, 2002
EPEC -related <i>E. coli</i>	MPSTQYIRRPASSYASCIW ^Y ATACASCHGR ^T TEP ^S LAT	Yamamoto <i>et al.</i> , 1997
<i>E. coli</i> 96-127-23 (chromosome)	MPSTQYIRRPASSYASCIW ^R ATACASCHGR ^T TKP ^S LAT	Zhou <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> 96-127-23 (plasmide)	MPSTQYIRRPASSYASCIWCATACASCHGE ^T TK ^S LAT	Zhou <i>et al.</i> , 2002
<i>E. coli</i> ECOR 33	MPSTQYIRRP ^T ISSYASCIWCATACASCHGR ^T TKP ^S LAT	Lai <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> ECOR 32	MPSTQYIRRP ^T ISSYASCIWCAT ^V CASCHGR ^T TKP ^S LAT	Lai <i>et al.</i> , 1999
<i>E. coli</i> ECOR 35	MPSTQYIRRP ^T ISSYASCIWCAT ^V CASCHGR ^T TKP ^S LAT	Lai <i>et al.</i> , 1999

Tableau II. Comparaison des séquences protéiques de 8 variants de E.AST1. Les positions des cystéines sont en gras et les acides aminés non-homologues sont soulignés.

Article 1

Article 1 :

Titre : Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals

Auteurs: Sophie Veilleux et J. Daniel Dubreuil

Journal : Veterinary research.

Année de publication: 2006

Volume : 37

Pages : 1-13

Contribution des auteurs : Moi, Sophie Veilleux, affirme avoir lu tous les articles utilisés pour effectuer cette revue de littérature et d'en avoir fait une synthèse qui a été publiée dans le journal mentionné ci-haut. La contribution de Dr. J. Daniel Dubreuil, pour cet article, fut de réviser la forme et le contenu ainsi que de me guider dans le processus d'écriture de l'article.

Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals

Sophie Veilleux and J. Daniel Dubreuil*

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada

* [REDACTED]

Short title: EAST1 toxin in farm animals

Abstract

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) heat-stable toxin 1 (EAST1) is a small toxin of proteic nature. The reference strain producing this toxin was originally detected in the stools of a diarrheic Chilean child. Today, we know that EAST1 is not solely associated with EAEC but also with many other diarrheic *E. coli* families. Some studies have established the role of EAST1 in human outbreaks of diarrhea. In addition, isolates from farm animals were shown, more recently, to carry the *astA* gene coding for EAST1. However, the relation between the presence of EAST1 and disease is not conclusive. In this article, the current state of the knowledge on the presence and probable role of EAST1 in farm animal diseases is reviewed and discussed.

Escherichia coli / EAST1 toxin / farm animals / diarrhea / edema disease

Table of contents

1. Introduction
2. EAST1 gene
3. EAST1 toxin
4. Epidemiology of EAST1 strains
 - 4.1 EAST1 in swine
 - 4.2 EAST1 in cattle
 - 4.3 EAST1 in sheep
 - 4.4 EAST1 in food products and water
5. Conclusions and perspectives

1. INTRODUCTION

The family of diarrheagenic *Escherichia coli* encompass various members including enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), and more recently, diffusely adherent *E. coli* (DAEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC) [25]. These *E. coli* are classified in different pathotypes based on the presence of specific virulence factors [18, 41]. Each pathotypes have various virulence factors that allow them to induce clinical symptoms with specific epidemiological and pathological characteristics [10, 33].

EAEC are *E. coli* strains that adhere in vitro to human epithelial cells (HEp-2) in a typical stacked brick pattern. EAEC strains do not produce heat-labile (LT) or heat-stable (ST) toxins [20]. EAEC were rapidly recognized as forming an important enteric pathogen group. They are responsible for diarrhea in travelers, children in the developing world and in HIV-infected patients [18]. Numbers of EAEC outbreaks occurred in developed and industrialized countries [18]. In some regions of the developing world, EAEC are the second most common cause of traveler's diarrhea only surpassed by ETEC. In humans, aggregative adherence fimbriae I and II (AAF-I and AAF-II), plasmid-encoded toxin (Pet) and the enteroaggregative *E. coli* heat-stable toxin 1 (EAST1) are some of the various virulence factors associated with the EAEC [23]. Recently, an *E. coli* strain (O166: H15) having EAST1 as the only known virulence factor has been the cause of a gastroenteritis outbreak in Osaka, Japan [50].

EAST1 was first discovered in EAEC strain 17-2 isolated from the stools of a Chilean child suffering of diarrhea [34]. EAST1 is the product of the *astA* gene that can be found on the chromosome and/or plasmids, in one or more copy [23]. EAST1 is a peptide of 38 amino acids with a molecular weight of 4.1 kDa. The four cysteines of the toxin are involved in the formation of two disulfide bridges [24]. Further studies associated EAST1 with *E. coli* pathotypes other than EAEC, such as EHEC, ETEC, DAEC and EPEC, and also with other bacterial genus like *Salmonella* [36]. Although clearly associated with *E. coli* strains isolated from humans, EAST1-positive strains have also been observed in farm animals. For now, it has been most commonly associated with swine and cattle. These strains are isolated from healthy or ill animals and are usually associated with symptoms like diarrhea and/or edema diseases [23]. Strain 17-2 was shown to cause diarrhea and sometimes death in a gnotobiotic piglet model [40].

An EAST1 variant, isolated from EAEC strain O-42, was observed in epidemiological studies [34]. EAST1 O-42 differs from EAST1 17-2 at codon 21 (ACA to GCA) leading to a single amino acid change (T to A) [23]. In humans, this variant is more frequently isolated from diarrhea-associated *E. coli* strains than EAST1 17-2. Furthermore, strain O-42 seems to be more virulent than strain 17-2, which failed to induce diarrhea, when administered to volunteers [26]. This study indicated that EAST1 produced by EAEC strain O-42 could represent a potent toxic molecule whereas the toxin elaborated by strain 17-2 would be a variant with lower potency [46]. Multiple other variants of EAST1 have been isolated from sporadic cases in the context of epidemiological studies [23]. These variants seem less

frequently distributed and their toxicity was not evaluated. These variants were discussed in details in the review by Ménard and Dubreuil [23]. In fact, these variants although described at the sequence level were not purified neither tested in an appropriate animal model or an in vitro test.

2. EAST1 GENE

The amino acid sequence of EAST1 was deduced from an ORF named *astA*, a 117-bp-long DNA sequence. The G+C content of *astA* is 53%, a little higher than the mean value for *E. coli* but EAST1 shows an atypically low codon adaptation index suggesting a deviation from the preferred codon usage in *E. coli*. The nucleotide sequences flanking *astA* ORF were not characterized and no promoter or regulator was identified. The gene *astA* has been observed in plasmids and on the chromosome of various isolates, in one or more copy. There is no homology between *astA* and *estA*, the structural gene for STa (see the review article by Ménard and Dubreuil [23]).

3. EAST1 TOXIN

EAST1 is a 38 amino acid peptide with a calculated molecular weight of 4.1 kDa and a pI of 9.25 (Tab. I). Unlike STa, a classic signal peptide was not observed in the N-terminus of the predicted EAST1 sequence. Most information on this toxin was acquired through the use of culture filtrates or by direct use of EAST1-producing strains as EAST1 was purified only recently [24]. Culture filtrates from EAEC strain 17-2, heated at 65 °C for 15 min, has demonstrated partial heat stability. Among the 38 amino acids composing EAST1, there are four cysteines at positions 17, 20, 24,

and 27, which have been shown recently to form two disulfide bridges [24]. Indirect evidence of the importance, for biological activity, of the disulfide bridges formed between cysteines 17 and 27 was obtained when cysteine 17 was replaced by an alanine it resulted in inactivation of EAST1 [23]. A synthetic peptide composed of residues 8 to 29 of EAST1 induced a response in Ussing chamber, indicating that the toxic domain was contained within this fragment [35].

EAST1 is often compared to STa, another *E. coli* heat-stable enterotoxin. Both are heat-stable toxins of low molecular weight (4.1 kDa for EAST1 and 2 kDa for STa) where disulfide bridges are present (2 bridges for EAST1 and 3 for STa). Considering the pI, EAST1 (pI = 9.25) and STa (pI = 3.98) are peptides with a net charge quite dissimilar. EAST1 shares 50% identity with the enterotoxigenic domain of STa (amino acid 6 to 18) [35]. Furthermore, EAST1 and STa share cGMP as second messenger in host intestinal epithelial cells [34]. The receptor for STa toxin is guanylate cyclase C and the amino acid sequence determined to bind to this molecule is NPAC (Tab. I). For EAST1 two amino acids (AC) are present and it is inferred that it may be responsible for binding to the same molecule. In the same in vitro model, EAST1 induced a response in approximately 30-40 min. as also observed for STa using rabbit ileal tissue. Savarino et al. [34] observed that under Cl^- and HCO_3^- -free conditions, the short circuit current was decreased suggesting that these ions could be involved in the electrical response observed. On the other hand, the reference enterotoxicity assay for STa using suckling mice (CD-1 and CFW mice) failed to elicit fluid accumulation with EAST1 [34]. However, Giannella [12] standard STa assay was originally done using Swiss Albino mice thus, sensitivity of the mouse

strains used could probably account for the lack of biological activity observed for EAST1. In Ussing chamber, polyclonal anti-STa antibody was inefficient in an attempt to neutralize EAST1 biological activity indicating that these toxins are immunologically different [34].

4. EPIDEMIOLOGY OF EAST1 STRAINS

EAEC affects children as well as adults from both developing and developed countries. The largest reported outbreak of diarrhea due to EAEC in human beings occurred in Japan [19]. This episode involved 16 schools with 2697 children suffering from diarrhea after consuming contaminated lunches shown to contain an EAST1-producing *E. coli* strain. Another study conducted in Spain has, as well, clearly shown an association between EAST1-positive strains and diarrhea in children [42].

Aggregative adherence to the intestinal mucosa is the first step in the pathogenesis of EAEC. EAST1 is a toxin that is thought to play a role in the pathogenesis of this group of bacteria although not all EAEC causing diarrhea elaborate EAST1. Numerous studies with human or animal isolates indicated that EAST1 is not restricted to EAEC [23]. The EAST1 toxin gene was not associated with porcine *E. coli* strains until 1997 [46]. Then, EAST1 toxin was reported in epidemiological studies involving swine and cattle suffering of diarrhea and/or edema disease [31]. In general, pathogenic *E. coli*, except EHEC, does not originate from animals but they spread to humans by food and water contaminated with excrements. Concerning food animals, cattle are the major reservoir of EHEC [33].

4.1. EAST1 in swine

The pathogenesis of EAEC infection is not fully understood but characteristic histopathological lesions and multiple virulence factors candidates were described. One of the toxins elaborated by these strains is EAST1.

Choi et al. [7] screened 720 *E. coli* strains, isolated from preweaning diarrheic piglets, for the presence of *astA* gene using Polymerase Chain Reaction (PCR). They evaluated the association between EAST1 gene and the following enterotoxins: STa, STb and LT. The authors found that one hundred and sixty-four (22.7%) isolates carried the gene for EAST1. Moreover, 62/164 (37.8%) isolates had EAST1 as the only known virulence factor. Of the 164 EAST1-positive strains, 46% possessed the STa gene. The major pathotypes observed in this study were, in decreasing order: EAST1, EAST1/STa, EAST1/STa/STb, EAST1/STa/F5, EAST1/STa/F4 and EAST1/STb/F4. The strong association between EAST1 and STa observed in this study may support the idea that genes encoding these enterotoxins are linked. In this study, the proportion of ETEC strains carrying EAST1 gene was 63% (ETEC being strains carrying gene for at least 1 fimbrial adhesin or enterotoxin). The results indicate that the gene encoding EAST1 is widely distributed among diarrheagenic *E. coli* isolated from preweaning piglets.

In another study, Choi et al. [8] screened 476 *E. coli* strains isolated from weaned pigs suffering from diarrhea and/or edema disease for EAST1 gene using PCR. One hundred and forty nine (31.3%) isolates contained the EAST1 gene. Of these 149

EAST1-positive isolates, 66 (44.3%) carried only EAST1 gene. Among the EAST1-positive strains 74/149 (49.7%) were ETEC (strains positive for at least one enterotoxin but without fimbrial adhesion factor), or 53/149 (35.6%) (strains with gene for enterotoxin(s) and fimbrial adhesion factor(s)) and 10.7% were shiga-like toxin producing (STEC) strains. Of the isolates known to carry genes for one or more toxins, 62 carried STa, 38 STb, 31 LT and 16 STx2e genes. The most common genotypes observed were in decreased order: EAST1, EAST1/STa, EAST1/STa/STb/LT, EAST1/STa/STb and EAST1/STa/LT. This study point out the high prevalence of EAST1-positive strains in weaned pigs suffering from diarrhea and/or edema disease and the possible association between EAST1 and STa genes. Together, these studies indicated that EAST1-positive strains are associated with pre- and postweaning diarrhea as well as edema disease. However, these associations do not mean that EAST1 plays an actual role in all these clinical problems.

Frydendahl [11] showed that of 563 *E. coli* isolates, associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs, 65.8% were EAST1-positive. All strains belonging to O149 serogroup harboured EAST1, STb and LT genes. In this study, O149 was the only serogroup carrying the F4 fimbriae. A close association of *astA* with F4 fimbrial marker was reported. Osek [31], analyzed 270 *E. coli* strains obtained from pigs with postweaning diarrhea, 46.4% of these isolates possessed *astA* as determined by PCR. All F4-positive *E. coli* strains from piglets with diarrhea were also EAST1-positive. F4 is a major adhesin of porcine ETEC and the association of EAST1 coding gene with F4-positive ETEC strains from piglets with diarrhea suggests that EAST1 may be a virulence marker of pathogenic isolates for these

animals. Furthermore, in porcine ETEC strains, the *astA* and F4 virulence genes are carried on separate plasmids [46]. The EAST1 gene sequence from pig *E. coli* isolates is identical to that of strain O-42 shown to be pathogenic for human volunteers [45]. Therefore, EAST1 expressed in pig isolates may play an active role in the pathogenesis of diarrhea. In fact, this study indicated that EAST1 gene is widely distributed among *E. coli* strains isolated from piglets with postweaning diarrhea. The toxin is closely associated with F4-positive ETEC that mainly express LTI or LTI and STb enterotoxins. The most common EAST1-positive serotype was O149:K91 and these strains were mostly LTI/STb. Noamani et al. [30] observed the *astA* gene and the K88c (F4) antigen in 135 isolates from O149 ETEC strains isolated from pigs with postweaning disease. Nucleotide sequences upstream of *astA* from porcine and bovine ETEC strains are identical, but differ from human ETEC, DAEC and EAEC [45]. A certain consensus among flanking sequences of *E. coli* human strains exist for *astA* [21, 47]. Nevertheless, a study by Yamamoto and Nakazawa [46] indicated heterogeneity in the DNA sequences between *E. coli* isolated from humans and those from animals.

As part of a study on the prevalence of AIDA-I (adhesion involved in diffuse adherence) among pigs with postweaning diarrhea or edema disease, Ha et al. [15], observed that of the 45 AIDA-I-positive isolates only 5 possessed the EAST1 gene. Ngeleka [27] identified two new *E. coli* pathotypes: AIDA-I/STb/EAST1 and AIDA-I/STb. In another study, 170 *E. coli* strains from diarrheic piglets and 120 strains isolated from non-diarrheic piglets were studied to identify *E. coli* that have the potential to cause diarrhea in pigs [28]. The main pathotype identified from diseased

animals was EAST1 (13.5%) and from healthy animals 10.8% of the isolates were EAST1-positive. Experimentally infected piglets with one EAST1-positive strain indicated that the selected isolate attached to epithelial cells, less than the isolates with AIDA-I pathotype, but failed to induce diarrhea. In that study, the authors concluded that the EAST1 pathotype alone is not able to induce diarrhea when given to piglet, and so, it should not be considered as an important marker for pathogenic *E. coli* isolated from piglet suffering of diarrhea [28]. Interestingly, the AIDA-I/STb/EAST1 and AIDA-I/STb pathotypes were isolated only from diarrheic piglets and accounted for 4.7% of isolates. Strains of these pathotypes induced diarrhea when inoculated in newborn colostrum-deprived pigs in contrast to isolates positive only for EAST1 that did not induce diarrhea, suggesting a synergistic action between these virulence factors.

In another study on the prevalence of AIDA-I, Ha et al. [16] also observed a positive association between AIDA-I and EAST1. They screened 1002 *E. coli* isolates from pre-weaned pigs with diarrhea in Korea and tested for the presence of EAST1 gene in AIDA-I-positive strains. Among the 23 AIDA-I-positive strains, 17 (73.9%) were also EAST1-positive. In addition, AIDA/EAST1 strains also possessed STa and/or STb genes suggesting a relation between these virulence traits.

Vu-Khac et al. [44] analyzed 92 isolates from 14 to 28 day-old piglets that died of diarrhea. The *astA* gene was detected in 49 (53.3%) of the isolates, 35 of which carried genes for enterotoxins and/or fimbriae. The major genotypes observed were F4/STb/EAST1, F18/STa/STb/EAST1, STb/EAST1, F6/STa/STb/EAST1 and

F18/STb/EAST1. Beside F4, the fimbrial antigen F18 is one of the most important fimbriae associated with pig postweaning diarrhea and/or edema disease. This study indicated that 10 out of 92 strains carried the gene for F18. Moreover, 37.7% of the 220 *E. coli* strains from 1 to 14-day-old piglets with diarrhea possessed the F4 gene and all F4-positive strains were *astA*-positive. This is in accordance with the studies of Noamani et al. [30] and Osek [31] that detected *astA* gene in 100% of Canadian and Polish F4 strains, respectively. A total of 34/37 STb-positive strains (either alone or in combination with other toxins) were also positive for EAST1. The importance of this toxin association may have an echo in the study of Berberov et al. [4] who recently demonstrated the concurrent expression of LT, STb and EAST1. This study clearly established, using an isogenic strain, that following inactivation of LT toxin production (by deletion), the development of less severe dehydrating diarrhea was observed. However, EAST1 and STb toxins together were responsible for water and electrolytes losses similar to those caused by LT. This study demonstrated that the effects of the three toxins studied were important and additive.

Recently, a study by Batisson et al. [3] have identified and characterized a new factor involved in the adhesion mechanism of attaching and effacing in *E. coli* in swine. The gene was coined *paa* for porcine attaching and effacing-associated gene. Sequence analysis of *paa* revealed an ORF of 753 bp encoding a 27.6 kDa protein with 100, 52 and 49% homology with Paa of enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strains (EDL933 and Sakai), PEB3 of *Campylobacter jejuni* and AcfC of *Vibrio cholerae*, respectively. The presence of *paa* and *eae* (a gene encoding intimin, an outer membrane protein involved in intimate attachment to host cells) sequences in the porcine O45 strains

was highly correlated with the attaching and effacing phenotypes. The observation of three *eae*-positive but *paa*-negative porcine EPEC (PEPEC) O45 strains that were attaching and effacing-negative in pig ileal explant culture [51] provided further evidence for the importance of the *paa* gene in the attaching and effacing activity of O45 strains. The complementation of *paa* mutant when performed, as expected, restored the attaching and effacing function confirming the involvement of Paa in PEPEC pathogenicity. The Paa protein is located on the surface of bacterial cells and chicken anti-paa antibodies were able to block the adhesion of *paa*-positive bacteria as determined using an ex vivo pig ileal explants. More recently, a study by Harel et al. (personal communication) indicated that, of 38 ETEC strains studied, carrying the *paa* gene, all were *astA*-positive and this gene was on the same plasmid as *paa*. A high correlation was noted between *paa* and *astA* indicating that it may play an important role in attaching and effacing function including the observed lesions and diarrhea.

4.2. EAST1 in cattle

Bertin et al. [6] tested 185 isolates of STEC from healthy cattle positive for the presence of *stx₂* (n = 104), *stx₁* (n = 18) or both toxins (n = 63). They analyzed by PCR 167 *stx₂*-positive and 18 *stx₁*-positive isolates for the presence of *astA*. The EAST1 gene was poorly present among the *stx₂*-positive isolates (6.5%) and was present in 50% of the *stx₁*-positive strains. Girardeau et al. [14] screened 77 *E. coli* *afa-8* (encoding an afimbrial adhesin) isolates from farm animals (mostly bovine) and humans to compare their virulence traits. They found that EAST1 gene was more prevalent in the isolates of the bacteremia-associated group. Their results showed a

significant prevalence of EAST1 gene and its association with *clpG* (the gene encoding the major subunit of CS31A) among extraintestinal *afa-8* isolates. The zoonotic potential of certain clones and the high prevalence of multiple antibiotic resistance among bovine *afa-8* isolates suggested that such strains could present a risk to public health. High prevalence of EAST1 toxin was also demonstrated in bovine CS31A-positive isolates [5]. It is noteworthy that bovine CS31A and porcine F4 are closely related fimbrial structures [13].

Stephan et al. [37] reported the first isolation of O157:H45 EPEC strains from cattle. The gene encoding EAST1 was found in 10 of the 11 strains studied. Cattle seem to be a reservoir of O157:H45 EPEC strains, which are described in association with human diseases. These strains could, in some instances, play a role as food-borne pathogens.

4.3. EAST1 in sheep

Cookson et al. [9] experimentally inoculated four lambs at 6 weeks of age with an *E. coli* O157:H7. Attaching-effacing lesions were observed in the caecum, proximal colon and rectum of one lamb. The attached bacteria did not immunostain with the O157-specific antiserum. From this animal, bacteriological analysis of samples, yielded two isolates O115:H(-), found to form microcolonies and attaching and effacing lesions on Hep-2 cells. Supernatants of both O115:H(-) isolates induced cytopathic effects on Vero cell monolayers. Both isolates encoded EAST1, CNF1 (cytotoxic necrotizing factor) and CNF2 toxins as determined by PCR analysis. These

E. coli strains exhibited a novel combination of virulence determinants and are the first isolates found to possess both CNF1 and CNF2.

4.4. EAST1 in food products and water

As swine, cattle and sheep are food animals, the presence of EAST1 toxin in bacterial isolates from these animals may result in a transmission to humans through the food chain. Toshima et al. [39] conducted a study on food heavily contaminated with coliforms (115 samples). Using PCR, they observed the highest prevalence of EAST1 gene in animal products tested (16/54, 29.6%). On the other hand, EAST1 was rarely found in foods of plant origin (2/45) or fishery products (1/16). Although EAST1 was unexpectedly common in animal products, its potential as a human pathogen remains uncertain as some virulence properties differed significantly between strains from fecal and food isolates. Some food isolates, however, possessed the same virulence characteristics as fecal isolates.

A few food-borne diarrhea outbreaks caused by atypical diarrheagenic *E. coli* strains involving adults have been reported. One outbreak in the USA involved more than 100 adults, patrons of the same restaurant, implicated an *E. coli* O39:NM [17]. This strain was LT, STa and STb-negative. Another diarrhea outbreak in Finland involving 650 humans (611 students and 39 adult in a school) was reported [43]. The pathogen responsible for this outbreak was an *E. coli* O111:B4. Interestingly, both *E. coli* responsible for the food-borne outbreaks were *astA*-positive.

In addition to food products, water contaminated by animal feces could also represent, in some regions of the world including industrialized countries, a way of transmission to human beings. For example, *E. coli* strains were associated with a waterborne diarrhea outbreak among students and teachers attending a fieldwork program held at a farm in Akita prefecture, Japan [49]. Of the 75 attendees, 41 students showed clinical signs including diarrhea (85% of patients). A marked difference in the attack rate was noted between students who drank tap water (86.1%) at the pasture and those who only washed their hands (26.3%). The tap water was provided from a brook but without chlorination. Seven *E. coli* Ouk:H45 isolates were recovered from the patients as the causative agent of the outbreak. One isolate was attaching and effacing (*eae*) and *astA*-positive. In this study, one strain, EC-3605 represented an atypical EPEC strain harbouring *astA*. The role that atypical EPEC strains harbouring the *astA* gene play in human disease is unclear.

These food-borne and water-borne diarrhea outbreaks in humans illustrate the problem that can be encountered when contamination from *E. coli* elaborating toxins such as EAST1 are associated with farm animals. However, in most epidemiological studies, evidence of such cross-contamination has not been published for EAEC that are EAST1-positive.

5. CONCLUSIONS AND PERSPECTIVES

For now, the pathogenicity of *E. coli* strains producing EAST1 only has not been determined in an animal model under rigorous experimental conditions. Studies on correlation between the presence of *astA* gene and expression of active EAST1 toxin

are also needed because PCR studies indicate the presence of *astA* but without certifying the synthesis of active toxin. The oligonucleotides primers used in the reported studies targets EAST1 17-2 and at best both variants 17-2 and O-42. Most of the time, variants of EAST1 other than 17-2 and O-42 are ignored suggesting that EAST1 is probably present more often than actually determined by PCR. Further studies may be needed to define a role of EAST1 in the pathogenesis of pig and cattle diarrhea. Contrarily to what was determined for human EAST1-positive strains, there is no clear evidence of EAST1-dependent fluid secretion in animal studies [22] or of an association of EAST1 with epidemic strains of *E. coli* with high diarrheagenic potential. The late purification of EAST1 toxin [24] by our group could provide a source of pure toxin in order to test if diarrhea could result from administration of pure toxin to animals without the cumbersome interpretation that we encounter when using *E. coli* isolates or crude culture supernatants. Another challenge for future studies will be to investigate if the numerous variants already reported for EAST1 toxin are actually toxic for farm animals and also to determine their association with diarrhea outbreaks occurring in farms animals. Challenging the suckling mouse assay, the standard STa assay for determination of the biological activity, with EAST1 could provide an answer to this question. As the already tested CD-1 and CFW mouse strains did not indicate toxicity for purified EAST1 from strain 17-2, Swiss albino mice as used by Giannella [12] in its reference assay, should be tested for comparison purpose [24]. Ussing chambers using rabbit ileal tissue could also represent another alternative test for toxicity [34].

A study of Bacciu et al. [2] indicated that an intergeneric transfer of virulence genes (involving the *astA* gene) via an insertion sequence (IS1414, encoding a transposase (*tnpA*) and *astA* in *Salmonella*) from *E. coli* together with studies reporting the presence of *astA* in bacterial genus beside *E. coli*, like *Salmonella* Agona [32] and *Klebsiella pneumoniae* [29] clearly indicate that horizontal transfer of virulence factors, including the *astA* gene, between bacterial genus occurs in nature and can account for the considerable distribution of EAST1 gene in *E. coli* beside EAEC. Yet, there is no evidence of EAST1-dependent fluid secretion in animal studies or of an association of EAST1 with epidemic strains of *E. coli* with high diarrheagenic potential [2].

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are financially partly supported by the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine.

REFERENCES

- [1] Aimoto S., Takao T., Shimonishi Y., Hara S., Takeda T., Takeda Y., Miwatani T., Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*, Eur. J. Biochem. 129 (1982) 257-263.
- [2] Bacciu D., Falchi G., Spazziani A., Bossi L., Marogna G., Leori G.S., Rubino S., Uzzau S., Transposition of the heat-stable toxin *astA* gene into a gifsy-2-related prophage of *Salmonella enterica* serovar Abortusovis, J. Bacteriol. 186 (2004) 4568-4574.
- [3] Batisson I., Guimond M.P., Girard F., An H., Zhu C., Oswald E., Fairbrother J.M., Jacques M., Harel J., Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*, Infect. Immun. 71 (2003) 4516-4525.
- [4] Berberov E.M., Zhou Y., Francis D.H., Scott M.A., Kachman S.D., Moxley R.A., Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins, Infect. Immun. 72 (2004) 3914-3924.
- [5] Bertin Y., Martin C., Girardeau J.P., Pohl P., Contrepolis M., Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea, FEMS Microbiol. Lett. 162 (1998) 235-239.
- [6] Bertin Y., Boukhors K., Pradel N., Livrelli V., Martin C., Stx2 subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle in France: detection of a

new Stx2 subtype and correlation with additional virulence factors, *J. Clin. Microbiol.* 39 (2001) 3060-3065.

[7] Choi C., Cho W., Chung H., Jung T., Kim J., Chae C., Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene in isolates in weaned pigs with diarrhea and/or edema disease, *Vet. Microbiol.* 81 (2001) 65-71.

[8] Choi C., Kwon D., Chae C., Prevalence of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin genes in *E. coli* isolated from diarrheic piglets, *J. Vet. Diagn. Invest.* 13 (2001) 26-29.

[9] Cookson A.L., Hayes C.M., Pearson G.R., Roe J.M., Wales A.D., Woodward M.J., Isolation from a sheep of an attaching and effacing *Escherichia coli* O115:H- with a novel combination of virulence factors, *J. Med. Microbiol.* 51 (2002) 1041-1049.

[10] Fasano A., Cellular microbiology: can we learn cell physiology from microorganisms? *Am. J. Physiol.* 276 (1999) C765-776.

[11] Frydendahl K., Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches, *Vet. Microbiol.* 85 (2002) 169-182.

[12] Giannella R.A., Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model, *Infect. Immun.* 14 (1976) 95-99.

[13] Girardeau J.P., Der Vartanian M., Ollier J.L., Contrepolis M., CS31A, a new K88-related fimbrial antigen on bovine enterotoxigenic and septicemic *Escherichia coli* strains, *Infect. Immun.* 56 (1988) 2180-2188.

- [14] Girardeau J.P., Lalioui L., Said A.M., De Champs C., Le Bouguenec C., Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections, *J. Clin. Microbiol.* 41 (2003) 218-226.
- [15] Ha S.K., Choi C., Chae C., Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease, *J. Vet. Diagn. Invest.* 15 (2003) 378-381.
- [16] Ha S.K., Choi C., Jung K., Kim J., Han D.U., Ha Y., Lee S.D., Kim S.H., Chae C., Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea, *J. Vet. Med. B* 51 (2004) 166-168.
- [17] Hedberg C.W., Savarino S.J., Besser J.M., Paulus C.J., Thelen V.M., Myers L.J., Cameron D.N., Barrett T.J., Kaper J.B., Osterholm M.T., An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*, *J. Infect. Dis.* 176 (1997) 1625-1628.
- [18] Huang D.B., Okhuysen P.C., Jiang Z.D., DuPont H.L., Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen, *Am. J. Gastroenterol.* 99 (2004) 383-389.
- [19] Itoh Y., Nagano I., Kunishima M., Ezaki T., Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 2546-2550.
- [20] Kaper J.B., Nataro J.P., Mobley H.L., Pathogenic *Escherichia coli*, *Nat. Rev. Microbiol.* 2 (2004) 123-140.

- [21] Lalioui L., Jouve M., Gounon P., Le Bouguenec C., Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves, *Infect. Immun.* 67 (1999) 5048-5059.
- [22] McVeigh A., Fasano A., Scott D.A., Jelacic S., Moseley S.L., Robertson D.C., Savarino S.J., IS1414, an *Escherichia coli* insertion sequence with a heat-stable enterotoxin gene embedded in a transposase-like gene, *Infect. Immun.* 68 (2000) 5710-5715.
- [23] Ménard L.P., Dubreuil J.D., Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist, *Crit. Rev. Microbiol.* 28 (2002) 43-60.
- [24] Ménard L.P., Lussier J.G., Lépine F., Paiva de Sousa C., Dubreuil J.D., Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1, *Protein Expr. Purif.* 33 (2004) 223-231.
- [26] Nataro J.P., Kaper J.B., Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11 (1998) 142-201.
- [25] Nataro J.P., Deng Y., Cookson S., Cravioto A., Savarino S.J., Guers L.D., Levine M.M., Tacket C.O., Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers, *J. Infect. Dis.* 171 (1995) 465-468.
- [27] Ngeleka M., Isolation of a new *Escherichia coli* pathotype associated with diarrhea in piglets, *Can. Vet. J.* 43 (2002) 623-624.
- [28] Ngeleka M., Pritchard J., Appleyard G., Middleton D.M., Fairbrother J.M., Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1

pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates, *J. Vet. Diagn. Invest.* 15 (2003) 242-252.

[29] Nguyen Thi P.L., Yassibanda S., Aidara A., Le Bouguenec C., Germani Y., *Enteropathogenic Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa, *Emerg. Infect. Dis.* 9 (2003) 135-137.

[30] Noamani B.N., Fairbrother J.M., Gyles C.L., Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs, *Vet. Microbiol.* 97 (2003) 87-101.

[31] Osek J., Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea, *Vet. Microbiol.* 91 (2003) 65-72.

[32] Paiva de Sousa C., Dubreuil J.D., Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*, *Int. J. Med. Microbiol.* 291 (2001) 15-20.

[33] Robins-Browne R.M., Bordun A.M., Tauschek M., Bennett-Wood V.R., Russell J., Oppedisano F., Lister N.A., Bettelheim K.A., Fairley C.K., Sinclair M.I., Hellard M.E., *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia, *Emerg. Infect. Dis.* 10 (2004) 1797-1805.

[34] Savarino S.J., Fasano A., Robertson D.C., Levine M.M., Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model, *J. Clin. Invest.* 87 (1991) 1450-1455.

[35] Savarino S.J., Fasano A., Watson J., Martin B.M., Levine M.M., Guandalini S., Guerry P., Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents

another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 90 (1993) 3093-3097.

[36] Savarino S.J., McVeigh A., Watson J., Cravioto A., Molina J., Echeverria P., Bhan M.K., Levine M.M., Fasano A., Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*, J. Infect. Dis. 173 (1996) 1019-1022.

[37] Stephan R., Borel N., Zweifel C., Blanco M., Blanco J.E., First isolation and further characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O157:H45 strains from cattle, BMC Microbiol. 4 (2004) 10.

[38] Takao T., Hitouji T., Aimoto S., Shimonishi Y., Hara S., Takeda T., Takeda Y., Miwatani T., Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D, FEBS Lett. 152 (1983) 1-5.

[39] Toshima H., Uenaka E., Bi Y., Nakamura H., Ogasawara J., Hase A., Kamata Y., Nishikawa Y., Detection and isolation of *Escherichia coli* with a coding gene for enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 from food and comparison with fecal isolates, J. Food Prot. 67 (2004) 2117-2122.

[40] Tzipori S., Montanaro J., Robins-Browne R.M., Vial P., Gibson R., Levine M.M., Studies with enteroaggregative *Escherichia coli* in the gnotobiotic piglet gastroenteritis model, Infect. Immun. 60 (1992) 5302-5306.

[41] Uzzau S., Fasano A., Cross-talk between enteric pathogens and the intestine, Cell Microbiol. 2 (2000) 83-89.

[42] Vila J., Gene A., Vargas M., Gascon J., Latorre C., Jimenez de Anta M. T., A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1), J. Med. Microbiol. 47 (1998) 889-891.

- [43] Viljanen M.K., Peltola T., Junnila S.Y., Olkkonen L., Jarvinen H., Kuistila M., Huovinen P., Outbreak of diarrhoea due to *Escherichia coli* O111:B4 in schoolchildren and adults: association of Vi antigen-like reactivity, *Lancet* 336 (1990) 831-834.
- [44] Vu-Khac H., Holoda E., Pilipcinec E., Distribution of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets in the Slovak Republic, *J. Vet. Med. B* 51 (2004) 343-347.
- [45] Yamamoto T., Echeverria P., Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans, *Infect. Immun.* 64 (1996) 1441-1445.
- [46] Yamamoto T., Nakazawa M., Detection and sequences of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene in enterotoxigenic *E. coli* strains isolated from piglets and calves with diarrhea, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 223-227.
- [47] Yamamoto T., Taneike I., The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution, *FEBS Lett.* 472 (2000) 22-26.
- [48] Yamamoto T., Wakisaka N., Sato F., Kato A., Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol. Lett.* 147 (1997) 89-95.
- [49] Yatsuyanagi J., Saito S., Miyajima Y., Amano K., Enomoto K., Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the

astA gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan, J. Clin. Microbiol. 41 (2003) 2033-2039.

[50] Zhou Z., Ogasawara J., Nishikawa Y., Seto Y., Helander A., Hase A., Iritani N., Nakamura H., Arikawa K., Kai A., Kamata Y., Hoshi H., Haruki K., An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1), Epidemiol. Infect. 128 (2002) 363-371.

[51] Zhu C., Harel J., Jacques M., Fairbrother J.M., Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea, Can. J. Vet. Res. 59 (1995) 118-123.

Table I. Primary sequence comparison of four heat-stable toxins elaborated by *E. coli*. The number of amino acids in the mature toxins is indicated in the second column. In bold is the sequence more or less conserved known to bind to guanylate cyclase C, the receptor for STa toxin. Underlined, the cysteine residues. The asterisks indicate the change in amino acids between EAST1 variant 17-2 and O-42. 1. Savarino et al. [35]; 2. Yamamoto et al. [48]; 3. Aimoto et al. [1]; 4. Takao et al. [38].

Toxin	Amino acids	Primary sequence
EAST1 17-2	38	MPSTQYIRRPASSYASCIWCT* ACASCHGR TTKPSLAT ¹
EAST1 O-42	38	MPSTQYIRRPASSYASCIWCA* ACASCHGR TTKPSLAT ²
STaH	19	NSSNYC <u>CELCC</u> NP <u>CATGCY</u> ³
STaP	18	NTFY <u>CCELCC</u> NP <u>ACAGCY</u> ⁴

Résultats

Article 2

Article 2 :

Titre : Purification of two variants of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable toxin 1 (EAST1) and evaluation of their toxicity

Auteurs: Sophie Veilleux et J. Daniel Dubreuil


Statut: En traitement

Contribution des auteurs : Moi, Sophie Veilleux, affirme être la principale investigatrice des travaux présentés et avoir lu tous les articles utilisés pour effectuer cet article. La contribution de Dr. J. Daniel Dubreuil, pour cet article, fut de m'épauler lors des expérimentations et de l'analyse des résultats ainsi que de réviser la forme et le contenu de l'article.

Purification of two variants of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable toxin 1 (EAST1) and evaluation of their toxicity

Sophie Veilleux and J. Daniel Dubreuil*

Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, Saint-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6, Canada



Short title: Purification and toxicity of EAST 1 variants 17-2 and O42

Abstract

The EAST1 (EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1) toxin is a 4.1 kDa peptide that was first detected in the EAEC strain 17-2 (O3:H2) isolated from the stool of a Chilean child suffering from diarrhea (Savarino *et al.* 1991). EAST1 is thought to play a role in the EAEC pathogenicity even if not all EAEC strains harbour the *astA* gene (Huang *et al.* 2004). The study undertaken was conducted in order to improve an already described purification protocol for EAST1 toxin to obtain more rapidly and in greater amount both EAST1 variants. Since EAST1 is often compared to Sta, the molecules were tested for biological activity using the suckling mouse assay, the reference test for STa. In order to ascertain the integrity of the disulfide bridges of the purified EAST1 toxin, the sample was treated with protein-disulfide isomerase (PDI). Using the suckling mouse assay we did not observe a positive gut to body (G/B) ratio for any of the toxin preparations tested. In Ussing chambers using two cell lines, we observed that the fusion proteins were not active but once cleaved and purified the EAST1 toxin showed a positive Δ isc. When the purified toxin preparations were treated with PDI, it resulted in an augmented toxicity. Overall, the T84 cell line was more sensitive than the IPEC J2. Taken together, our results have shown that active EAST1 toxin, as determined in Ussing chambers, can be purified in larger amount and more rapidly than when using the already published method (Ménard *et al.* 2004). The use of affinity chromatography makes the protocol more accessible for laboratory not specialized in purification.

Introduction

Some strains of *Escherichia coli* are diarrheagenic and these are classified into six pathotypes (enterotoxigenic *E. coli* (ETEC), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), enteropathogenic *E. coli* (EPEC), enteroinvasive *E. coli* (EIEC), diffusely adherent *E. coli* (DAEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC)) based on the presence of various virulence factors (Robins-Browne *et al.* 2004). The EAEC pathotype is now reconized as an important enteric pathogen in both developed and the developing world (Huang *et al.* 2004 ; Piva *et al.* 2003). It has been associated with persistant diarrhea in children, nosocomial and community outbreaks worldwide and food-borne diseases (Henderson *et al.* 1999, Tsai *et al.* 2003). EAEC are defined by a characteristic aggregative pattern of adherence to HEp-2 cells (Okeke *et al.* 2000). There are variation of pathogenecity among EAEC strains and the pathophysiology of diarrhea caused by EAEC, including the virulence markers needed to cause diarrhea, are not well understood (Jiang *et al.* 2002; Harrington *et al.* 2006). The EAEC strains cause a secretory diarrhea (i.e. watery stools containing mucus) (Henderson *et al.* 1999). Up to these days, two prominent histopathologic features have been described: the formation of a thick mucus gel on the intestinal mucosa followed by mucosa damage, apparently by the elaboration of mucosa-damaging toxin(s) (Eslava *et al.* 1998). Most of the EAEC strains have the *pAA* plasmid encoding many virulence factors, associated with the EAEC, including the Aggregative Adherence Fimbriae I and II (AAFI / AAFII) (Okeke *et al.* 2000 et Zamboni *et*

al. 2004). Even if many studies have associated the *pAA* plasmid with the EAEC, none associated the plasmid with the apparition of the disease (Okeke *et al.* 2000). However, it seems that none of the EAEC virulence factors described is present in all the EAEC strains (Bouzari *et al.* 2001; Ménard and Dubreuil, 2002).

The EAST1 (EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1) toxin is encoded by the *astA* gene, a 117bp long DNA sequence. The *astA* gene was first detected in the EAEC strain 17-2 (O3:H2) isolated from the stool of a Chilian child suffering from diarrhea (Savarino *et al.* 1991). EAST1 is tough to play a role in the EAEC pathogenicity even if not all EAEC strains arbour the *astA* gene (Huang *et al.* 2004). To these days, many epidemiological studies have associated the *astA* gene with *E. coli* pathotypes other than EAEC like ETEC and EHEC and other bacteria genus like *Salmonella* (Veilleux et Dubreuil, 2006; Paiva de Sousa et Dubreuil, 2001). The *astA* gene is found in 50% of the EAEC strains and is present among the *E. coli* strains causing diarrhea (Zhou *et al.* 2002; Yamamoto and Taneike, 2000).

The *astA* gene can be found under plasmidic and/or chromosomic form, in one or many copies in the bacteria (Ménard *et al.* 2004). It is a 38 amino acids peptide with a low molecular weight of 4.1 kDa. The sequence of EAST1 contains four cysteines that are involved in the formation of two disulfide bridges in a C1-C2 and C3-C4 conformation (Savarino *et al.* 1993 et Ménard *et al.* 2004). The disulfide bridge formed by Cys 17 and Cys 27 seems to be implicated in the toxicity of EAST1 toxin, since replacement of Cys 17 by an

alanine induced a loss of enterotoxicity (Fasano 1999). Using a synthetic peptide of residues 8 to 29 of EAST1 toxin, Savarino *et al.* (1993) observed enterotoxic activity in Ussing chambers model. A study from Morabito *et al.* (1998), using hybridation and polymerase chain reaction (PCR), suggested the presence of variability in the nucleotidic sequence of the *astA* gene among the different *E. coli* groups.

The role of EAST1 in diarrhea remains an open question because the *astA* gene is detected in pathogenic and commensal *E. coli* strains (Kaper *et al.* 2004). Nevertheless, in 1996, an *E. coli* strain that had *astA* gene as the only known virulence factor was isolated from the stool of patients during an outbreak of gastroenteritis in Osaka city, Japan (Toshima *et al.* 2004; Nishikawa *et al.* 2002).

EAST1 is often compared with *E. coli* enterotoxin STa (heat-Stable Toxin A) (Piva *et al.* 2003). Like EAST1, STa toxin is known to cause secretory diarrhea (Greenberg *et al.* 1997). The interaction of STa toxin with the guanylate cyclase C (GC-C), his receptor, induced an increase of the concentration of intracellular cGMP (Cyclic Guanosine MonoPhosphate) in the intestinal cells leading to chloride secretion and diarrhea (Fasano, 2002). The cGMP is one of the three intracellular pathways that intestinal cells use for the regulation of electrolytes and water fluxes across the intestinal mucosa (Fasano, 2002). Like STa, EAST1 seems to be an agonist of guanylin, the natural ligand for GC-C (Fasano, 2002). However, EAST1 and STa are immunologically different since no cross-neutralization of EAST1 was observed using polyclonal

anti-STa in Ussing chambers (Savarino *et al.* 1991). Unlike STa, no classic signal peptide was observed in the N-terminus of the EAST1 sequence (Ménard and Dubreuil, 2002).

Although EAST1 17-2 was the first variant discovered, another variant isolated from the EAEC strain O42 seems to be more important in epidemiological studies (Ménard *et al.* (2002). The O42 variant is different from 17-2 by one base at codon 21 (ACA -> GCA) leading to a change in the amino acid (threonine to alanine) (Yamamoto *et al.* 1997). Nataro *et al.* (1995) used volunteer experiments in an attempt to establish a model for EAEC infection and to determine a pathogenic strain. In this study, only 1 of the 19 subjects challenged with EAEC 17-2 had mild diarrhea. In contrast, 3 of the 5 volunteers challenged with EAEC O42 developed diarrhea. One of these subjects experienced 7 days of diarrhea (Nataro *et al.* 1995). Based on these observations, we believe that EAST1 O42 is more potent and that EAST1 17-2 variant has an altered toxicity. Other variants of EAST1 toxin with gene sequence differing from variant 17-2 and O42 have been identified in strains from serotypes other than EAEC (Yamamoto *et al.* 1997).

The *astA* gene is also detected in *E. coli* strains isolated from animal host mostly porcine, bovine and sheep (Veilleux et Dubreuil, 2006; Cookson *et al.* 2002; Vu-Khac *et al.* 2004).

Most of the studies on EAST1 toxins use PCR to detect the *astA* gene, but only few perform toxicity test. Unfortunately, the detection of a gene using PCR or hybridation assays does not warrant the production and secretion of a

functional toxin by the bacteria in amount that enable the apparition of symptoms. For EAST1, the toxicity data available when we started this study were, in general, performed with culture supernatants ultracentrifuge, using the fraction corresponding to 2 kDa – 5 kDa, since the purification to homogeneity of EAST1 toxin is recent (Savarino *et al.* 1996 and 1991; Nataro *et al.* 1995; Ménard *et al.* 2004). Nevertheless, the use of ultracentrifuge supernatants is a very unreliable method since the *astA* gene can be found in both plasmidic and/or chromosomic form in one or many copie in the bacteria. Thus, the amount of toxin found in the supernatant should be dosed. An enterotoxic activity was observed for an *astA* negative DAEC strain, using ultracentrifuge culture supernatant in rabbit ligated loops model and Y1 cells monolayer cytotoxicity test (Sousa, 2003). Other molecules with small molecular weight can be present in the sample and be responsible for enterotoxicity, leading to false positive results.

The study undertaken was conducted in order to improve an already described purification protocol for EAST1 toxin to obtain more rapidly and in greater amount of both EAST1 variants. Since EAST1 is often compared to STa the molecules were tested for biological activity using the suckling mouse assay, the reference test for STa. As well, Ussing chambers was tested using two cell lines in order to evaluate and compare the biological activity of both EAST1 variants purified following this new protocol.

Materials and methods

Strains and media

An *E. coli* BL21 transformed with plasmid pGEX-2T-EAST1 (17-2) and one transformed with plasmid pGEX-2T-EAST1 (O-42) were used to produce EAST1. Transformants were cultivated on Luria-Bertani broth agar medium to which 50µg/mL of ampicillin were added (Ménard *et al.* 2004).

Production of EAST1

An overnight culture of *E. coli* BL21 containing the pGEX-2T-EAST1 (17-2 or O-42) plasmid was diluted 100 times in 2L Luria-Bertani medium (10g/L bactotryptone, 5g/L yeast extract, and 5g/L NaCl, adjusted to pH 7.4) supplemented with 100µg/mL ampicillin and grown at 37°C with agitation (180 rpm). When optical density reached 0.5 at 600nm, expression of the fusion protein was induced for three hours by addition of IPTG at a final concentration of 0.1mM. Cells were harvested by centrifugation at 6000 rpm for 10min. at 4°C and resuspended in 120mL PBS (140mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄ and 1.8mM KH₂PO₄, pH 7.3), the centrifugation step was repeated twice. The supernatant was discarded and cells were frozen at -20°C overnight to weaken the bacterial cells. The bacterial cells were thawed, suspended in 20mL lysis buffer (50mM Tris, 200mM NaCl, 1mM DTT, 5% glycerol and 5µL of Pefabloc (100mg/mL) (Roche Applied Biosciences)). The lysis of bacterial cells was done using a Cole Parmer sonicator (4 X 15sec). Then, 10mM MgCl₂ and 1µg/mL DNase I was added and the solution was incubated with slow stirring at 4°C for 30min. The lysed bacterial cell preparation was centrifuged at 11 000 rpm for 1h at 4°C. The cell lysis supernatant was collected.

Glutathione Sepharose affinity chromatography

The GST-EAST1 fusion protein contained in the cell lysis supernatant was filtered using 0.2µM Acrodisc filter (Pall, Gelman Sciences) and affinity purified using a 5mL GStrapp column (Amersham Biosciences) coupled to an ÄKTA FPLC purification system (GE Healthcare). Each injection contained 5mL of cell lysis supernatant loaded on the column at a flow rate of 1mL/min. After loading, the GST-EAST1 fusion protein was eluted using elution buffer (50mM Tris-HCl, 10mM reduced glutathione, pH 8.0) (Sigma).

Xa cleavage of GST-EAST1

After elution the sample is loaded on a 5mL HiTrap desalting column (Amersham Biosciences) using Xa factor buffer (Tris-HCl 50mM, NaCl 150mM, CaCl₂ 1mM at pH 7.5). The fusion protein is eluted and then cleaved using 10µg of Xa factor (Roche applied sciences) followed by incubation overnight at 4°C with low stirring.

Second affinity chromatography step

The cleaved EAST1 toxin went through a second affinity chromatography step using a 5mL GStrap column (Amersham biosciences) coupled to an AKTA purifier 10. The cleaved EAST1 toxin was obtained directly in the flow through following injection of the sample. The GST was eluted using elution buffer (50mM Tris-HCl, 10mM reduced glutathione, pH 8.0 (Sigma) in order to regenerate the column. The toxin was then loaded

on a 5mL HiTrap desalting column (Amersham biosciences) run in HPLC water (J.T Baker). The eluted fractions were then frozen at -80°C and lyophilized.

Gel filtration chromatography of purified EAST1

A purified preparation of EAST1 17-2 toxin was chromatographed on a Superdex G-75 column, in order to estimate the molecular weight of the purified material as well as the integrity and purity. The column was run in 0.05M phosphate buffer (pH 7.0) at 1mL per min. Different proteins were used as standards; Soybean Trypsin Inhibitor (26 kDa), egg white lysozyme (14.1 kDa) and aprotinin (6.5 kDa), all purchased from Sigma.

N-terminal amino acid sequencing

For N-terminal amino acid analysis, the purified EAST1 toxin was dot-blotted on a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Bio-Rad). The N-terminal amino acid sequence was determined by standard Edman degradation on a ProciseTM microsequencer (Applied Biosystems, Foster City, California, USA). The first 10 amino acids were determined to compare with the expected sequence for EAST1.

Protein- disulfide isomerase (PDI) treatment of EAST1 toxin

In order to ascertain the integrity of the disulfide bridges of the purified EAST1 toxin the sample was treated with protein-disulfide isomerase (PDI) from bovine liver (Sigma). The treatment was done as recommended by the manufacturer with an incubation time of 30 min.

Suckling mouse assay

The suckling mice assay was performed as previously described by Giannella (1976) with some modifications. Each experimental group contained 5 newborn suckling mice CD-1 (Swiss albinos) (Charles River Laboratories) which were administered orally 10 or 15 μL containing (or not) the EAST1 toxin (PDI treated or not) or appropriate control plus 1 μL of a 2% Evans blue solution. Evans blue was used to ascertain the proper administration of the sample. Each sample contained 20 or 40 mg/mL of trypsin inhibitor (Roche Applied Sciences) as a protease inhibitor. Following the administration of the toxic preparation or control the mice were left at 37°C for 3h. The mice were then euthanized using carbon dioxide. The entire intestine was removed and weighted, so the gut to remaining body weight ratio could be calculated. Samples with ratio over 0.083 were considered toxic, as determined by Giannella (1976). The appropriate buffers were used as negative control and STa enterotoxin (5U) (Sigma) was used as positive control.

Ussing chambers

Each sample was tested in two distinct Ussing chambers, using 12 days-old T84 or IPEC J2 (intestinal pig epithelial cells) cells seeded on Corning Transwells. The cell monolayers were mounted in modified Ussing flux chambers and bathed in 5mL of Ringer solution at 37°C on both apical and basolateral sides. The Ringer solution was maintained at 37°C throughout the experiment with a circulated air lift system with 5% CO₂. The voltage was clamped to 0mV and the resulting short circuit current (*I_{sc}*) was continuously recorded. The monolayer was allowed to acclimate for more than 5 minutes to insure that the *I_{sc}* was stable before the addition of any compounds.

In each experiment, the positive control was a solution of 10 μ M of Forskolin. The negative control was 1mL of Ringer solution. The lyophilized samples solubilized in 1mL of deionized (dI) water, were vortexed, left at room temperature for 5 min. and vortexed again. The samples were applied on the apical side of the cell monolayer and tested in separate Ussing chambers. During the experiment, a volume of Ringer solution was removed from the chamber and immediately replaced with an equal volume of the sample, and then mixed thoroughly. At the end of each experiment, a positive control was added to the chambers previously exposed to the sample to ascertain cell viability.

Results

The study undertaken was conducted in order to improve an already described purification protocol for EAST1 toxin, by Ménard *al.* (2004), to obtain more rapidly and in greater amount both EAST1 variants, in an attempt to evaluate their respective toxicity in the suckling mouse assay and the Ussing chambers.

Production of the GST-EAST1 fusion protein

Many modifications were done to the production protocol for GST-EAST1 to specifically minimize the proteolysis that was observed by Ménard *et al.*, (2004). The first modification concerns the culture medium used. We used LB broth (10g/L NaCl, 5g/L yeast extract and 10 g/L de tryptone) at pH 7.4, that differs from the LB broth used by Ménard *et al.* (2004) which contained 5g/L of tryptone to which 2g/L of dextrose were added. Lysis of the bacterial cells was done using sonication (45 sec.). Sonication is quicker and gives a better lysis rate then when lysozyme was used. This modification

increased the amount of fusion protein available for purification. Since proteolysis was an acute problem observed following cell lysis, we used a new generation of protease inhibitor that could be more active in preventing digestion of the fusion protein. Complete protease inhibitor (Boehringer-Mannheim) plus the addition of PMSF was used by Ménard *et al.* (2004). We replaced this cocktail by Pefabloc (Roche applied sciences) an irreversible serine protease inhibitor with broad specificity. This protease inhibitor is readily soluble in aqueous buffers at neutral pH (up to 2.8g/L). The half-life of Pefabloc (Roche applied sciences) is also much longer than PMSF.

Purification of the GST-EAST1 fusion protein

A prepacked 5mL GSTrapp column (GE Healthcare), was used for the purification of GST-EAST1 by affinity. In contrast, Ménard *et al.* (2004) used Glutathion Sepharose gel (Amersham Biosciences) packed manually in a syringe (1mL). The GSTrap column (GE Healthcare) was coupled to an AKTA FPLC purification system (GE Healthcare), that allowed to load the sample at a flow rate of 2mL/min compared to 0.2mL/min when using a « home-made » column coupled to a conventional (P-1) peristaltic pump (Ménard *et al.*, 2004).

Xa cleavage of the GST-EAST1 fusion protein

Before cleaving the purified fusion protein, the buffer was changed for the Xa factor buffer (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl and 1mM CaCl₂ at pH 7.5). Ménard *et al.* (2004) used dialysis to change the buffer. The dialysis was a time consuming process (3 X 1h.) Using a desalting column (5mL HiTrap desalting prepacked column GE Healthcare)

couple to an AKTA FPLC purification system (GE healthcare), the desalting step was done in a few minutes. In addition, there was little loss of fusion protein with the chromatography step compared to dialysis. Ménard *et al.* (2004) had observed a great loss of the fusion protein during the dialysis process, probably caused, in part, by the adsorption to the dialysis membrane. Another negative point for the dialysis step is that the sample volume is doubled diluting the sample. Finally, we cannot exclude the action of protease during the long dialysis step since no protease inhibitor was added because of the large buffer volume.

EAST1 toxin purification

Ménard *et al.* (2004) used HPLC chromatography for the purification of the EAST1 toxin. This approach produce only few micrograms of toxin for a 1L batch (Ménard *et al.* 2004). We used affinity chromatography to purified the cleaved EAST1 toxin. A 5 mL GSTrap column (GE healthcare) coupled to an AKTA purifier 10 purification system (GE healthcare) was used to trap the GST protein. The cleaved EAST1 toxin flowed through the column and was eluted rapidly. The GST was then eluted to regenerate the column. Affinity chromatography gave highly reproducible results. This purification step was done using PBS and reduced L-glutathion as buffer instead of organic solvent as acetonitrile and trifluoroacetic acid (TFA) for HPLC chromatography (Ménard *et al.* (2004). Our modified method was much quicker (total of 4 days instead of 6) compared to what was described by Ménard *et al.* (2004). The identity of purified EAST1 was checked by N-terminal sequencing. This showed that the first 10 amino acid corresponded to the expected sequence for EAST1. The molecular weight of the toxin

preparation was evaluated by gel filtration on a Superdex G-75 (Figure 1). The peak eluted at approximately 4-5kDa.

Suckling mouse assay

Enterotoxicity of the purified EAST1 toxin was evaluated using the suckling mouse assay and groups of 5 CD-1 (Swiss albino) mice (2-4 days old). The samples (10 μ L) were administered orally and the mice were kept for 3h. and then euthanized. A gut to body (G/B) ratio higher than 0.083 was considered positive for enterotoxicity as determined for STa by Giannela (1976). Mice that regurgitated part of the sample were excluded from the study (*Table 2*). STa enterotoxin was used as positive control and water and the PDI master mix used for the isomerase reaction, as negative control. Enterotoxicity was observed for STa (5 U) for which a G/B ratio of $0.122 \pm X$ was observed. No toxicity was observed for the negative controls tested. For EAST1 17-2 and O42 samples treated or not with PDI no toxicity was observed in suckling mouse assay as the G/B ratio was always smaller than 0.083. The sample containing 15 μ g and 7.5 μ g of toxin (17-2 or O42) killed all the mice in each group before the end of the 3h. Nevertheless, no fluid accumulation was observed in the intestine of mice in these groups. No significant differences were observed for the G/B ratios between groups that received EAST1 17-2 or O42 or the groups treated or not with the PDI.

Ussing Chambers

Two cellular models were used to conduct the Ussing chambers studies (*Table 3*). Forskolin, an adenylate cyclase activator, was used as a positive control. At 10 μ M a *Disc*

signal of 5.50 was observed. Negative controls consisted of either Ringer's solution for most tests except that PDI master mix served as negative control for PDI-treated toxin preparation. A positive result was arbitrarily set-up at twice the value observed for the respective negative controls.

Using IPEC J2 cells (Intestinal Pig Epithelial Cells Jejunum 2), high amounts of GST-EAST1 O42 and 17-2 (respectively, 1206 and 896 μg) did not provoke a positive ΔI_{sc} signal. When these fusion proteins were cleaved and the pure toxin tested, 250 μg O42 toxins induced a ΔI_{sc} of 1.25 compared to 0.58 for 17-2. Treatment of purified toxin preparations with protein-disulfide isomerase, to restore the proper S-S bridges contained in EAST1, for respectively 160 and 148 μg of O42 and 17-2 a ΔI_{sc} of 1.24 and 3.20 were recorded.

Using T84 cell line, high amounts of fusion proteins GST-EAST1 O42 (3618 μg) was negative whereas for 2688 μg of 17-2 a positive ΔI_{sc} of 0.60 was observed. With cleaved and purified toxin, O42 and 17-2 were positive (2.35 for 230 μg of O42 and 2.43 for 208 μg of 17-2). In addition, with T84 cells we could observe a dose-response with increasing amount of toxin. Treatment with PDI clearly increased the ΔI_{sc} as for O17-2 for an equivalent amount of toxin the response in Ussing chambers doubled while for O42, 320 μg also showed an augmented response.

Discussion

Our study has shown that EAST1 toxin can be purified in larger quantity (*Table 2*) using affinity chromatography making it more accessible for laboratories that are not

specialized in purification. From 1L of bacterial culture, we obtained about 3 times more toxin compared to the quantity of EAST1 17-2 obtained by Ménard *et al.* (2004) (0.925 compared to 0.290 mg). Many of the time consuming steps used by Ménard *et al.* (2004), as dialysis for example, were replaced by quicker steps. The HPLC chromatography step that necessitates organic solvent was replaced by affinity chromatography using PBS to which reduces L-glutathione was added as elution buffer. This modification allowed highly reproducible purification results and higher amount of EAST1 toxin. The molecular weight of the toxin, its integrity and purity were determined using a Superdex G-75 column (Pharmacia). The elution profile was compared to protein standards. As expected, EAST1 toxin eluted after aprotinin as its molecular mass is smaller. The molecular mass of EAST1 was estimated to 4-5 kDa. In addition, the elution profile of purified EAST1 O42 toxin, showed a single peak, indicating purity and integrity of the preparation. The N-terminal sequencing of the preparation indicated that the purified molecule's amino acid sequence corresponded to what is expected for EAST1.

Our results indicate that CD-1 mouse may not be a suitable animal model for the study of EAST1 since no enterotoxicity was observed for EAST1 17-2 and O42 (treated or not with PDI) in the suckling mice assay. These results support the study of Ménard *et al.* (2004) which could not observe toxicity using CD-1 and CFW mice. Since the PDI could allow the proper formation of disulfide bridges and that no enterotoxicity was observed for the toxin treated with this enzyme, it is possible that CD-1 mice do not possess the EAST1 receptors. Because mice inoculated with STa (5 U) gave positive results, we can conclude that EAST1 and STa do not use the same molecule as receptor in the intestine.

These results goes against the already reported comparison of EAST1 with STa (Savarino *et al.* 1993). Another hypothesis to explain the lack of activity can be that the amount of toxin needed to observe enterotoxicity in mice killed them before delivery of toxin to the intestine. In our study, all the mice receiving 7.5 μ g and 15 μ g of toxin died within 1h. and these animals were cyanosed. The cause of death, even if unknown, could be attributable to the toxin since no mortality was observed in the negative control groups. It is difficult to know if the absence of enterotoxicity is due to the death of the mice before the toxin gained the intestine or because the absence of the EAST1 receptor in these animals. For STa, we already know that the susceptibility of infant mice can vary for the toxin preparation in various mouse strains (Bertin, 1992).

Our study in Ussing chambers, indicated that IPEC J2 cells were less sensitive to EAST1 toxin compared to T84 cells, since less significant ΔI_{sc} values were observed using the IPEC J2 cells, for all EAST1 samples tested. Fusion protein (except GST-EAST1 17-2 at 2688 μ g) was not active compared to cleaved toxin indicating that EAST1 may be internalized in the GST or not capable to interact with its receptor on the cell surface. We observed more activity for EAST1 O42 compared to 17-2 in the IPEC J2 cells but equivalent ΔI_{sc} values were observed in the T84 cells model (*Table 3*). Using PDI-treated toxin an increased response was observed and could be interpreted as the disulfide bridges adopted proper configuration resulting from the enzymatic treatment. Treatment of the fusion protein with glutathion, during the elution of the fusion protein from the affinity purification step, may affect the folding of the molecule and the disulfide bridging between cysteines found in EAST1, resulting in a less toxic molecule as revealed in Ussing chambers. We believe that T84 cells (from human colon) could be

used as an *in vitro* model to study EAST1 enterotoxicity as it seems more sensitive to EAST1 compared to IPEC J2 (from pig jejunum).

Taken together, our results have shown that EAST1 toxin can be purified in larger amount and more rapidly than the already published method (Ménard *et al.* 2004). Nevertheless, using the suckling mouse assay of Giannella and two mouse strains (1976), we could not show a positive G/B ratio. The results obtained can indicate that contrary to what is suggested by some authors (Savarino *et al.*, 1993, Fasano, 1999 and Kaper *et al.* 2004) EAST1 receptor is not GC-C (guanylate cyclase-C), as determined for STA. Nevertheless, Ussing chambers could effectively be used to determine the relative toxicity of EAST1 variants and/or mutants. For now, additional studies will have to be conducted to clarify the status of EAST1 as a toxin involved in the pathogenesis of *E. coli* diarrhea.

Acknowledgements

The authors are financially partly supported by the Canadian Research Network on Bacterial Pathogens of Swine. The authors would like to thank Carmen Veilleux (Cégep de Sherbrooke) and Natalee Holt (Kansas University) for their technical help and support for the toxicity tests.

Table I: Comparison of the quantity of EAST1 toxin (mg) purified from 1L of bacterial culture broth using Ménard *et al.* (2004) or the method described in this study.

Method used	Quantity of EAST1 toxin purified from 1L of bacterial culture (mg)	
	O42 variant	17-2 variant
Ménard <i>et al.</i> (2004)	ND*	0.290
This study	0.880	0.925

*Not determined

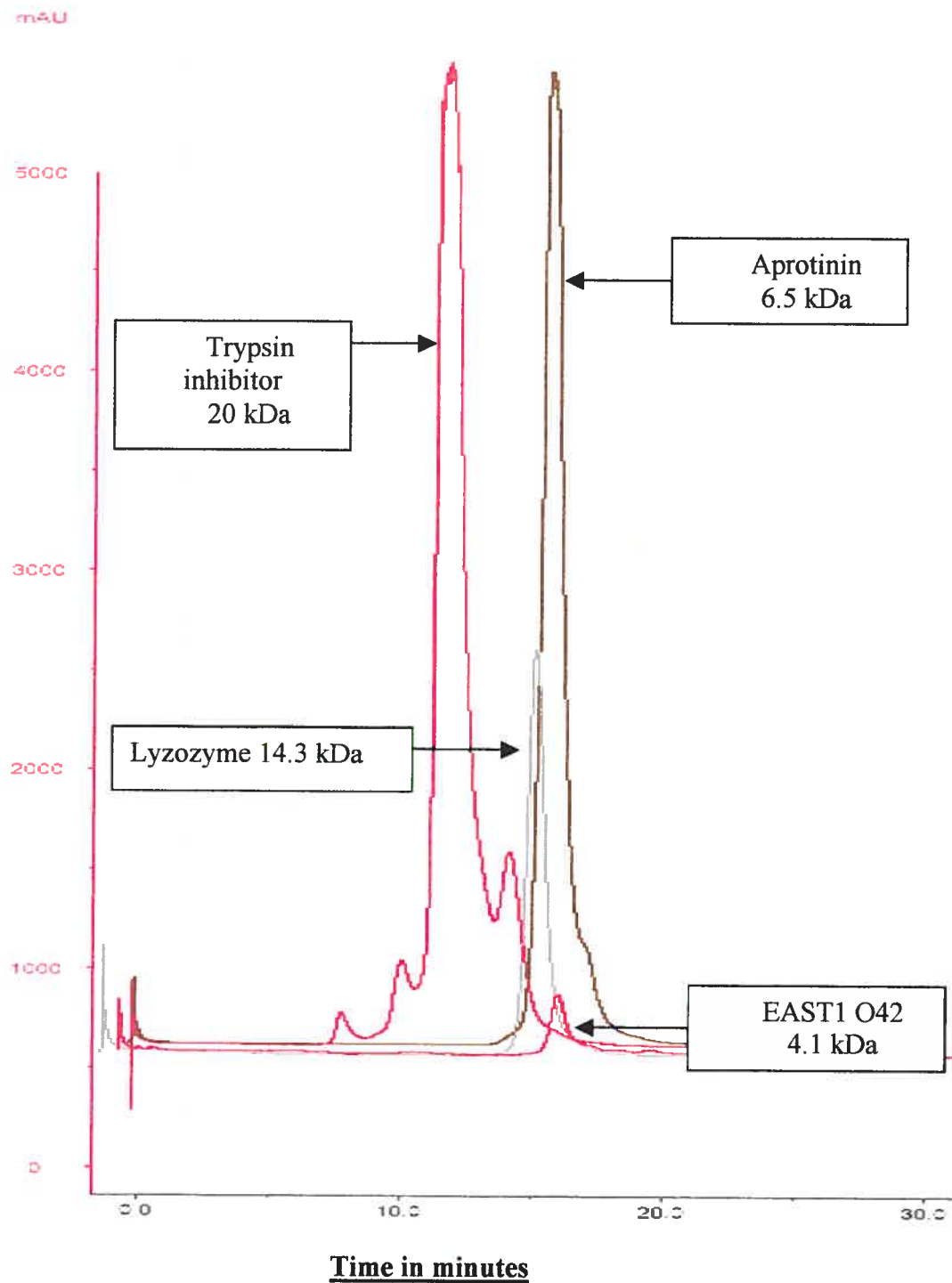
Table II: Samples tested and G/B ratio obtained in the suckling mice assay when testing EAST1 toxin variants 17-2 and O42 treated or not with protein disulfide isomerase (PDI). The sign (*) indicates that all the mice in the group died in less than the 3h. before euthanasia.

Sample	Quantity (µg) or unit (U)	Mice	G/B ratio± average
Water	N/A	5	0.059 ± 0.003
STa (Sigma)	0.3 U	5	0.054 ± 0.002
	1.5 U	5	0.066 ± 0.002
	5.0 U	5	0.122 ± 0.014
	PDI master mix	N/A	5
EAST1 17-2	1.5	5	0.059 ± 0.002
	2.0	5	0.047 ± 0.001
	4.0	5	0.057 ± 0.003
	*7.5	5	0.052 ± 0.006
	*15.0	5	0.047 ± 0.004
EAST1 17-2 PDI treated	2.5	5	0.054 ± 0.002
	5.0	5	0.055 ± 0.003
EAST1 O42	1.5	4	0.057 ± 0.001
	2.0	5	0.055 ± 0.003
	4.0	5	0.055 ± 0.001
	*7.5	4	0.059 ± 0.003
	*15.0	5	0.052 ± 0.003
EAST1 O42 PDI treated	2.5	5	0.055 ± 0.003
	5.0	5	0.055 ± 0.002

Table III: Ussing chambers results, using IPEC J2 and T84 cells as cellular model, forskolin (10 μ M) as positive control and Ringer solution and PDI mix as negative controls. All values over 2x the negative control (Ringer solution (0.40) or PDI mix (0.60)) are considered as negatives. Numbers in bold are considered as positive responses.

Cellular model	Sample	Quantity (μ g)	ΔI_{sc} (μ A cm ⁻²)
IPEC J2	GST-EAST1 O42	1206	0.03
	EAST1 O42	115	0.14
		250	1.25
	EAST1 O42 PDI treated	160	1.24
	GST-EAST1 17-2	896	0.03
	EAST1 17-2	104	0.16
		250	0.58
	EAST1 17-2 PDI treated	74	1.17
		148	3.20
	PDI master mix	1.0mL	0.30
	Forskolin	10μM	5.50
	Ringer solution	0.3 mL	0.20
T84	GST-EAST1 O42	3618	0.10
	EAST1 O42	115	1.67
		230	2.35
	EAST1 O42 PDI treated	320	6.61
	GST-EAST1 17-2	2688	0.60
	EAST1 17-2	104	2.08
		208	2.43
	EAST1 17-2 PDI treated	222	5.12
	PDI master mix	1.0mL	0.30
		Forskolin	10μM
	Ringer solution	0.3 mL	0.20

Figure 1: Comparison of the elution profile of soybean trypsin inhibitor (26 kDa), egg white lysozyme (14.1 kDa), aprotinin (6.5 kDa) and EAST1 O42, using a Superdex G-75 column (Pharmacia) coupled to an AKTA purifier 10 purification system (GE Healthcare). The arrow indicates EAST1 with a molecular mass of 4-5 kDa.



References

1. **Bertin, A.** 1992. Comparison of susceptibility of inbred and outbred infant mice to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa. *Infect. Immun.* **60**:3117-21.
2. **Bouzari, S., A. Jafari, A. Azizi, M. Oloomi, and J. P. Nataro.** 2001. Short report: characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Iranian children. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **65**:13-4.
3. **Cookson, A. L., C. M. Hayes, G. R. Pearson, J. M. Roe, A. D. Wales, and M. J. Woodward.** 2002. Isolation from a sheep of an attaching and effacing *Escherichia coli* O115:H- with a novel combination of virulence factors. *J. Med. Microbiol.* **51**:1041-9.
4. **Eslava, C., F. Navarro-Garcia, J. R. Czezulín, I. R. Henderson, A. Cravioto, and J. P. Nataro.** 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **66**:3155-63.
5. **Fasano, A.** 1999. Cellular microbiology: can we learn cell physiology from microorganisms? *Am. J. Physiol.* **276**:C765-76.
6. **Fasano, A.** 2002. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut* **50** Suppl 3:III9-14.
7. **Giannella, R. A.** 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect. Immun.* **14**:95-9.
8. **Greenberg, R. N., M. Hill, J. Crytzer, W. J. Krause, S. L. Eber, F. K. Hamra, and L. R. Forte.** 1997. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J. Invest. Med.* **45**:276-82.
9. **Harrington, S. M., E. G. Dudley, and J. P. Nataro.** 2006. Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS Microbiol. Lett.* **254**:12-8.
10. **Henderson, I. R., S. Hicks, F. Navarro-Garcia, W. P. Elias, A. D. Philips, and J. P. Nataro.** 1999. Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. *Infect. Immun.* **67**:5338-44.
11. **Huang, D. B., P. C. Okhuysen, Z. D. Jiang, and H. L. DuPont.** 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am. J. Gastroenterol.* **99**:383-9.
12. **Jiang, Z. D., D. Greenberg, J. P. Nataro, R. Steffen, and H. L. DuPont.** 2002. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J. Clin. Microbiol.* **40**:4185-90.
13. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat. Rev. Microbiol.* **2**:123-40.

14. **Menard, L. P., and J. D. Dubreuil.** 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit. Rev. Microbiol.* **28**:43-60.
15. **Menard, L. P., J. G. Lussier, F. Lepine, C. Paiva de Sousa, and J. D. Dubreuil.** 2004. Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expr. Purif.* **33**:223-31.
16. **Morabito, S., H. Karch, P. Mariani-Kurkdjian, H. Schmidt, F. Minelli, E. Bingen, and A. Caprioli.** 1998. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J. Clin. Microbiol.* **36**:840-2.
17. **Nataro, J. P., Y. Deng, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, and C. O. Tacket.** 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J. Infect. Dis.* **171**:465-8.
18. **Nishikawa, Y., Z. Zhou, A. Hase, J. Ogasawara, T. Kitase, N. Abe, H. Nakamura, T. Wada, E. Ishii, and K. Haruki.** 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. *Jpn. J. Infect. Dis.* **55**:183-90.
19. **Okeke, I. N., A. Lamikanra, J. Czeczulin, F. Dubovsky, J. B. Kaper, and J. P. Nataro.** 2000. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. *J. Infect. Dis.* **181**:252-60.
20. **Paiva de Sousa, C., and J. D. Dubreuil.** 2001. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *Int. J. Med. Microbiol.* **291**:15-20.
21. **Piva, I. C., A. L. Pereira, L. R. Ferraz, R. S. Silva, A. C. Vieira, J. E. Blanco, M. Blanco, J. Blanco, and L. G. Giugliano.** 2003. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **41**:1827-32.
22. **Robins-Browne, R. M., A. M. Bordun, M. Tauschek, V. R. Bennett-Wood, J. Russell, F. Oppedisano, N. A. Lister, K. A. Bettelheim, C. K. Fairley, M. I. Sinclair, and M. E. Hellard.** 2004. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* **10**:1797-805.
23. **Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine.** 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* **87**:1450-5.
24. **Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry.** 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**:3093-7.

25. **Savarino, S. J., A. McVeigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine, and A. Fasano.** 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* **173**:1019-22.
26. **Sousa, C. P.** 2003. EAST1 and its presence in a changing microbial world. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **9**.
27. **Toshima, H., E. Uenaka, Y. Bi, H. Nakamura, J. Ogasawara, A. Hase, Y. Kamata, and Y. Nishikawa.** 2004. Detection and isolation of *Escherichia coli* with a coding gene for enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 from food and comparison with fecal isolates. *J. Food. Prot.* **67**:2117-22.
28. **Tsai, C. C., S. Y. Chen, and H. Y. Tsen.** 2003. Screening the enteroaggregative *Escherichia coli* activity and detection of the *aggA*, *aafA*, and *astA* genes with novel PCR primers for the *Escherichia coli* isolates from diarrhea cases in Taiwan. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **46**:159-65.
29. **Veilleux, S., and J. D. Dubreuil.** 2006. Presence of *Escherichia coli* carrying the EAST1 toxin gene in farm animals. *Vet. Res.* **37**:3-13.
30. **Vu-Khac, H., E. Holoda, and E. Pilipcinec.** 2004. Distribution of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets in the Slovak Republic. *J. Vet. Med. B. Infect. Dis. Vet. Public Health* **51**:343-7.
31. **Yamamoto, T., and I. Taneike.** 2000. The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution. *FEBS Lett.* **472**:22-6.
32. **Yamamoto, T., N. Wakisaka, F. Sato, and A. Kato.** 1997. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**:89-95.
33. **Zamboni, A., S. H. Fabbricotti, U. Fagundes-Neto, and I. C. Scaletsky.** 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* **42**:1058-63.
34. **Zhou, Z., J. Ogasawara, Y. Nishikawa, Y. Seto, A. Helander, A. Hase, N. Iritani, H. Nakamura, K. Arikawa, A. Kai, Y. Kamata, H. Hoshi, and K. Haruki.** 2002. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). *Epidemiol. Infect.* **128**:363-71.

Discussion

Les objectifs de ce projet de maîtrise consistaient, dans un premier temps, en la mise au point d'une nouvelle méthode de purification des variants O42 et 17-2 de l'entérotoxine EAST1 en se basant sur la méthode décrite par Ménard *et al.* (2004). Les sous-objectifs étaient de diminuer le phénomène de protéolyse observé et le temps nécessaire à la production de toxine ainsi que d'optimiser la quantité de toxine obtenue. Le deuxième objectif de ce projet était d'évaluer l'entérotoxicité des variants O42 et 17-2 de la toxine EAST1. Pour ce faire, deux modèles d'étude furent sélectionnés, soit les chambres de Ussing et le test des souriceaux ou « suckling mouse assay ». Les chambres de Ussing ont déjà été utilisées par Savarino *et al.* (1993) pour étudier l'entérotoxicité de EAST1 et de peptides synthétiques de la séquence de EAST1. Par contre, nous avons utilisé des lignées cellulaires, IPEC J2 pour « intestinal pig epithelial cells jejunum 2 » et T84, un modèle moins coûteux et plus facile à utiliser que les segments d'intestin de lapin New-Zealand, utilisés par Savarino *et al.* (1993). Quant au test des souriceaux, il s'agit d'une méthode de référence pour la détermination de l'entérotoxicité de STa. Tout comme la méthode d'origine décrite par Giannella (1976), nous avons utilisé des souriceaux CD-1, aussi nommé Swiss albinos, de 2-5 jours. Il est possible que les ponts disulfures de la toxine EAST1 purifiée aient été altérés par l'absence de passage dans l'espace périplasmique lors de la production et / ou par les multiples étapes de chromatographie, en présence de divers agents chimiques. En effet, la protéine de fusion GST ne possède pas de séquence signal lui permettant d'être sécrétée à l'extérieur de la bactérie, c'est pourquoi la récolte de la protéine de fusion était réalisée par lyse totale des bactéries. Aussi, la L-glutathione réduite, utilisée lors de

l'élution de la protéine de fusion, pourrait altérer l'intégrité des ponts disulfures. Nous avons traité de la toxine EAST1 O42 et 17-2, purifiée avec l'enzyme PDI pour « protein-disulfide isomerase » (sigma) afin de s'assurer qu'un résultat négatif, lors des tests de toxicité, ne soit pas dû à l'absence d'un ou deux ponts disulfure de la toxine. La toxicité des deux types de toxine (traitée avec la PDI et non-traitée) a été testée parallèlement dans le cadre des tests de toxicité chez les souriceaux et dans les chambres de Ussing.

Tout d'abord, il est important de dire que le protocole de Ménard *et al.* (2004) n'a pas permis la purification de EAST1 en quantité suffisante, pour réaliser un travail à grande échelle. Aussi, de nombreuses variantes de ce protocole ont été testées avant d'obtenir des quantités satisfaisantes de toxine pour le travail envisagé dans ce projet.

Plusieurs modifications ont été effectuées dans la partie « production » de la protéine de fusion GST-EAST1, pour tenter de diminuer les pertes de toxine observées à ce niveau et de rendre l'ensemble du processus de purification plus accessible et plus rapide. (Voir Tableau III p.103)

Lors de la lyse des bactéries, Ménard *et al.* (2004) utilisaient un traitement au lysozyme pendant une heure, à 4°C, avec agitation. Nous avons substitué cette étape par une sonication trois fois 15 secondes, à l'aide d'un sonicateur Cole-Parmer. Cette modification est évidemment moins longue, soit 45 secondes pour cette méthode, par rapport à 1h pour le protocole de Ménard *et al.* (2004). De plus, l'utilisation du sonicateur permet un taux de lyse de beaucoup supérieur à la lyse observée avec le traitement au lysozyme, ce qui permet la libération d'une plus grande quantité de protéine de fusion et donc augmente le rendement de la méthode de production. En ce qui concerne le tampon de lyse, Ménard *et al.* (2004) utilisaient des comprimés

d'inhibiteur de protéase « Complete protease inhibitor » (Boehringer-Mannheim), additonnés de PMSF, pour contrôler la protéolyse. Les comprimés d'inhibiteur de protéase sont très peu solubles dans le tampon de lyse utilisé (50mM Tris, 200mM NaCl, 1mM DTT et 5% glycérol). Nous avons donc remplacé ce mélange par l'inhibiteur de protéase Pefabloc (Roche applied sciences), parfaitement soluble, dans le tampon de lyse, à une concentration de 30 μ g/mL. Une dernière modification, bien que mineure, apportée à cette partie du protocole est que le bouillon de culture utilisé est une bouillon Luria-Bertani (LB) (10g/L NaCl, 5g/L extrait de levure et 10 g/L de tryptone) à une pH de 7.4 alors que le bouillon LB utilisé par Ménard *et al.* (2004) contenait 5g/L de tryptone et était additionné de 2g/L de dextrose.

En ce qui concerne les étapes de chromatographie d'affinité, nous utilisons une colonne d'affinité prête à l'usage GSTrap de 5mL (GE healthcare) alors que Ménard *et al.* (2004) fabriquaient leur propre colonne en ajoutant la résine « Glutathion Sepharose » (Amersham biosciences) dans une seringue. L'utilisation d'une colonne « prepacked » rend cette méthode beaucoup plus accessible aux autres laboratoires n'ayant pas d'expertise en chromatographie. Aussi, nous utilisons la colonne GSTrap 5mL (GE healthcare) couplée à une système de purification AKTA FPLC qui permet le chargement de l'échantillon sur la colonne à un débit de 2mL/min. comparativement à 0.2mL/min. utilisé par Ménard *et al.* (2004) lorsque couplée à une pompe péristaltique conventionnelle (P-1) (Pharmacia). Ceci permet de diminuer le temps de contact entre l'échantillon et la colonne (moment entre le chargement et l'élution) de manière significative; environ 13h pour Ménard *et al.* (2004) et 30min. pour la nouvelle méthode. Bien sûr, la diminution du temps de contact entre

l'échantillon et la colonne permet de réduire les risques de perte de la toxine par protéolyse, précipitation et / ou adhérence non-spécifique à la matrice de la colonne.

Pour l'étape suivante consistant au clivage de la protéine de fusion avec le facteur Xa (Roche applied sciences), nous avons remplacé l'étape de dialyse (d'environ 3h) par une étape de chromatographie de désalage. La dialyse faite par Ménard *et al.* (2004) exigeait la préparation de 12 L de tampon de facteur Xa (50mM Tris-HCl, 150mM NaCl et 1mM CaCl₂ à pH 7.5), l'utilisation de membranes de dialyse et augmentait considérablement le volume de l'échantillon, diluant du même coup la protéine de fusion GST-EAST1. Nous avons observé une perte significative, voir totale, de la protéine de fusion lors de l'étape de dialyse. Ceci pouvant être expliqué par la dilution de l'échantillon et l'adhérence possible de la protéine de fusion à la membrane de dialyse. Nous avons substitué cette étape de dialyse par une étape de désalage, utilisant une colonne « Hitrap desalting » prête à l'usage de 5mL (GE healthcare) couplée à un système de purification AKTA FPLC (GE healthcare). La chromatographie de désalage permet de changer le tampon d'un échantillon, dans ce cas l'échantillon de départ est dans le tampon d'élution (L-Glutathion réduite) et suite à cette étape, on obtient la protéine de fusion dans le tampon de clivage du facteur Xa. Cette alternative demande la préparation de 250mL de tampon de facteur Xa (comparativement à 12L pour l'ancienne méthode) et prend 40 min. contrairement à 3h pour la dialyse.

Suite à au clivage de la protéine de fusion GST-EAST1, Ménard *et al.* (2004) utilisaient la chromatographie HPLC, avec une colonne C8 (Perkin-Elmer), pour purifier la toxine EAST1. Nous avons tenté de purifier la toxine EAST1 par cette étape sans succès. Nous avons amélioré, un peu, le rendement en changeant

l'acétonitrile, utilisée par Ménard *et al.* (2004) par le méthanol. En effet, le méthanol permet une meilleure séparation des pics d'élution que l'acétonitrile, dû à une sélectivité différente. Le rendement de toxine purifiée restait néanmoins très faible, de l'ordre de 0.1 ng pour une production.

De plus, il est connu que la chromatographie HPLC peut altérer la structure des petits peptides tel que EAST1 et les rendre inactifs. Puisque notre but était d'obtenir de la toxine EAST1 purifiée afin d'effectuer des tests de toxicité, l'intégrité de la structure et de l'activité de la toxine étaient primordiales. Nous avons donc remplacé l'étape de chromatographie HPLC par une deuxième étape de chromatographie d'affinité. Cette tactique nous permet de récolter la toxine EAST1 pure puisque lors du chargement de l'échantillon (ne contenant que la protéine GST et la toxine EAST1) sur une colonne GSTrap 5mL (GE healthcare) la toxine n'adhère pas à la matrice de la colonne et est récoltée directement dans le tampon de chargement. On peut par la suite éluer la GST afin de régénérer la colonne.

Cette nouvelle méthode permet d'augmenter la quantité de toxine EAST1 purifiée. Ménard *et al.* (2004) rapportent obtenir 0.29 mg de toxine EAST1 pure pour 1 litre de bouillon de culture. Les modifications apportées au protocole nous permettent d'obtenir respectivement 10 mg de toxine EAST1 O42 et 4.5mg de toxine EAST1 17-2 par litre de bouillon de culture. Ménard *et al.* (2004) ne rapportent pas de différence de rendement entre les productions de toxines EAST1 O42 et EAST1 17-2. Dans notre cas, suite au clivage de la protéine de fusion par le facteur Xa, un petit précipité est observé pour le variant EAST1 O42. Cependant, ce précipité est plus important pour le variant 17-2 de la toxine et explique probablement pourquoi nous observons

un rendement deux fois plus élevé pour la production du variant O42 par rapport au variant 17-2.

Finalement, suite à l'obtention de toxine EAST1 O42 et EAST1 17-2 purifiée, nous pouvions poursuivre avec les tests d'entérotoxicité. Dans un premier temps, nous avons voulu déterminer si les deux variants de EAST1 étaient actifs dans le modèle du souriceau nouveau-né. Ce test d'entérotoxicité aussi nommée « Suckling mouse assay » constitue la méthode de référence pour la toxine STa (Giannella, 1976). À l'aide de ce test, Greenberg *et al.* (1997) ont observé une accumulation de fluides dans l'intestin induite par la toxine STa. Savarino *et al.* (1991) ont tenté de déterminer la toxicité de EAST1 à l'aide de ce test, en utilisant une fraction de surnageant de culture de *E. coli* 17-2 de poids moléculaire se situant entre deux et cinq kDa. Par contre, la méthodologie utilisée par Savarino *et al.* (1991) et celle décrite par Giannella (1976) pour l'étude des entérotoxines de *E. coli*, dont STa diffèrent. La même méthodologie fut utilisée, i.e le modèle des souriceaux, par Ménard *et al.* 2004 en utilisant de la toxine EAST1 17-2 purifiée à homogénéité. Or, ni Savarino *et al.* (1991) ni Ménard *et al.* (2004) ne font mention du nombre de souriceaux utilisés, on peut donc se demander si les résultats observés sont statistiquement valables.

Nous avons donc tenté les tests d'entérotoxicité sur les souriceaux nouveaux-nés en utilisant de la toxine EAST1 17-2 et EAST1 O42, purifiée par notre nouvelle méthode. Chaque groupe était constitué de 5 souriceaux CD-1 (ou Swiss albinos) âgés de 2 à 4 jours, choisis au hasard et provenant de 10 portées. Les souriceaux étaient séparés de leurs mères immédiatement avant l'expérimentation, en accord avec les protocoles de Giannella (1976) et de Dean *et al.* (1972). Les préparations

toxiques étaient constituées de diverses quantités de toxine EAST1 (17-2 ou O42), préalablement désalées et lyophilisées et resolubilisées dans de l'eau stérile. De plus, les préparations contenaient un inhibiteur de trypsine (sigma) à une concentration de 20mg/mL ou 40mg/mL ainsi que 2% de bleu Evans (Voir annexe I). Le rôle de l'inhibiteur de trypsine étant de diminuer le risque de protéolyse de EAST 1 lors de son passage dans l'estomac des souriceaux alors que le bleu Evans permet de s'assurer du passage de l'échantillon dans l'estomac et dans l'intestin. Giannela (1976), Dean *et al.* (1972) et Ménard *et al.* (2004) gavaient les souriceaux avec une préparation toxique d'un volume de 100µL. Nous avons utilisé un volume de 10 µl ou 15 µL au plus, puisqu'il était impossible de faire ingérer un plus grand volume sans risquer un régurgitation de l'échantillon par le souriceau ou d'induire la suffocation. Suite au gavage des souriceaux, ceux-ci étaient déposés par groupe, sur un tapis chauffant, pour une période d'incubation de 3h. Par la suite, nous procédions à l'euthanasie des souriceaux, par inhalation de gaz carbonique puis à la dissection afin d'obtenir le poids de l'intestin et de la carcasse. Un ratio poids de l'intestin vs. poids de la carcasse (ratio I/C) supérieur à 0.083 était considéré comme positif pour l'activité entérotoxique (Giannela, 1976). Par la suite, une moyenne du ratio I/C était calculée pour chaque groupe (voir Tableau IV p. 104). Les souriceaux, ayant régurgité leur dose d'échantillon, ont été exclus du calcul de la moyenne.

Les doses de 15 µg et 7.5 µg de toxine EAST1 (O42 et 17-2) ont entraîné la mort des souriceaux avant la fin de la période d'incubation (3h). Ces souriceaux semblaient avoir souffert de suffocation et étaient cyanosés. Par contre, aucune accumulation de fluide n'a été observé dans l'intestin. Il est difficile de savoir si

l'absence d'accumulation de fluide dans l'intestin de ces souriceaux est dûe à l'inactivité de EAST1 dans ce modèle ou au décès prématuré des souriceaux.

Aucune différence de la valeur du ratio (I/C) n'est observable entre les groupes de variants (O42 vs. 17-2) ou même entre les groupes de traitement (toxine originale vs. toxine traitée avec la PDI). Le seul groupe ayant obtenu un résultat positif (ratio I/C = 0.122) est le groupe témoin positif. Bien entendu pour les groupes témoins négatifs ayant reçu selon le cas de l'eau ou la solution maîtresse de PDI, aucune accumulation de fluide n'a été observée.

Le traitement de la toxine avec l'enzyme PDI, assurant la formation adéquate des ponts disulfures, ne permet pas d'observer une accumulation de fluide dans les intestins. Il est donc probable que les souriceaux CD-1 (Swiss albino) ne possèdent pas le récepteur pour la toxine EAST1 et donc, que cette toxine diffère de STa contrairement à ce qui est décrit dans la littérature (Savarino *et al.* 1993). Il est aussi possible que les doses de toxine nécessaire à l'apparition de symptôme d'entérototoxicité, entraînent d'autres problèmes mortels (cyanose) tels qu'observés pour les groupes ayant reçu 7.5 µg et 15 µg de EAST1 (O42 ou 17-2). Les résultats obtenus semblent indiquer que le souriceau nouveau-né (2-5 jours) ne semble pas être un bon modèle d'étude pour la toxine EAST1 (O42 et 17-2).

Un autre modèle d'étude, les chambres de Ussing, fût utilisé pour l'étude de l'entérototoxicité des variants O42 et 17-2 de EAST1. Les chambres de Ussing constituent un modèle d'étude *in vitro* versatile puisqu'il permet l'utilisation d'une multitude de tissus épithéliaux et de différentes lignées de cellules en culture.

Dans le cadre de ce projet, les lignées cellulaires IPEC J2 et T84 furent utilisées. Ces lignées ont l'avantage d'être plus économiques et plus pratiques

comparativement à l'utilisation de segment d'intestin de lapin New-Zealand white tel qu'utilisé par Savarino *et al.* (1991 et 1996).

Pour ce modèle, un tissu ou lignée de cellules en culture est fixé à un support et placé dans une cuve contenant un tampon choisi. Par la suite, la toxine à l'étude peut être ajoutée sur la face apicale ou basolatérale des cellules ou du tissu et on observe une modification du « short circuit courant » (I_{sc}) indiquant un flux d'ion.

Les tests de chambres de Ussing furent effectués en utilisant la protéine de fusion GST-Xa-EAST1 (O42 ou 17-2) et la toxine purifiée comme échantillon et les cellules en culture IPEC J2 ou T84 de 12 jours. La monocouche de cellules est fixée sur un support « Corning transwells » (Corning) et installée dans la chambre de Ussing. Les cotés basolatéral et apical des cellules furent baignés dans 5mL de solution de Ringer, à 37°C, en présence de 5% de CO₂. Une période d'acclimatation de 5 min. est nécessaire avant l'ajout de tout échantillon afin de s'assurer que le I_{sc} soit stable. Pour cette expérimentation, 10 µM de forskolin fut utilisé comme témoin positif et 1mL de solution de Ringer comme témoin négatif. Avant l'expérimentation, l'échantillon fut resolubilisé dans 1mL d'eau, puis ajouté sur la face apicale de la monocouche de cellules. À la fin de l'expérimentation, le témoin positif (forskolin) était ajouté afin de s'assurer de la viabilité des cellules utilisées.

À la lumière de nos résultats, le modèle cellulaire T84 semble plus adéquat que les cellules IPEC J2 pour l'étude de l'entérototoxicité de la toxine EAST1 (*Table III p. 87*). Pour des quantités de toxine similaires, les valeurs de ΔI_{sc} étaient plus significatives en utilisant les cellules T84, en comparaison aux valeurs obtenues à l'aide des cellules IPEC J2.

Aussi, il semble possible que le processus de chromatographie affecte la formation des ponts disulfures de la toxine EAST1, par l'interaction de la protéine de fusion avec la glutathione. Une mauvaise conformation de la toxine peut résulter en une perte ou diminution de l'activité dans les chambres de Ussing. Le traitement préalable de l'échantillon, à l'aide de la PDI, permet d'observer une augmentation significative des valeurs de ΔI_{sc} .

Aucune variation significative du *I_{sc}* fut observée pour les protéines de fusion GST-EAST1 O42 et GST-EAST1 17-2, à l'exception de l'échantillon contenant 2688 μ g de GST-EAST1 17-2, comparativement à la toxine clivée. Il est possible que la toxine soit internalisée dans la protéine GST ou que la conformation de la protéine de fusion ne permet pas l'interaction avec le récepteur cellulaire.

Le variant O42 est plus actif dans le modèle des cellules IPEC J2 que le variant 17-2. Par contre, en utilisant les cellules T84, nous observons des valeurs de ΔI_{sc} similaires.

Nous croyons que les cellules T84 (cellules de colon humain) constituent un modèle d'étude de la toxine EAST1 plus sensible que les cellules IPEC J2 (cellules de jéjunun porcine).

Tableau III: Description des différences entre la méthode de production de toxine EAST1 élaborée par Ménard *et al.* (2004) et celle mise au point dans le cadre de ce projet de maîtrise.

Étape	Ménard <i>et al.</i> (2004)	Nouvelle méthode
Bouillon de culture	10g/L NaCl 5g/L extrait de levure 5g/L Tryptone 2g/L dextrose pH 7.4	10g/L NaCl 5g/L extrait de levure 10g/L Tryptone pH 7.4
Lyse bactérienne	Lysozyme 1h.	sonicateur 45 sec.
Inhibiteur de protéase	1. " Complete protease inhibitor" (Boehringer-Mannheim) 2. PMSF	Pefabloc (Roche applied sciences)
Appareil de purification	Applied Biosystems 130A Separation System (Pharmacia)	1.AKTA purifier 10 HPLC (GE heathcare) 2.AKTA FPLC (GE heathcare)
Temps de contact (chromatographie d'affinité)	environ 13 heures	30 minutes
changement de tampon (élution -> tampon facteur Xa)	1. dialyse (12 L tampon facteur Xa) 2. durée : 3h	1. désalage (250mL tampon facteur Xa) 2. durée : 40min.
Purification de EAST1	Chromatographie HPLC	Deuxième étape de chromatographie d'affinité
Quantité de toxine purifiée pour 1L de bouillon de culture	0.29mg	10mg de EAST1 O42 4.5mg de EAST1 17-2
Durée totale de la production	6 jours	4 jours

Tableau IV : Tableau récapitulatif des résultats obtenus lors des tests d'entérototoxicité sur les souriceaux nouveaux-nés.

N/A : non-applicable

Échantillon	Quantité (µg)	Nombre de souriceaux	moyenne ratio I/C
eau	N/A	5	0.059 ± 0.003
STa (Sigma)	~0.3 un.	5	0.054 ± 0.002
	~1.5 un.	5	0.066 ± 0.002
	~5.0 un.	5	0.122 ± 0.014
Solution maîtresse PDI	N/A	5	0.058 ± 0.001
EAST1 17-2	1.5	5	0.059 ± 0.002
	2.0	5	0.047 ± 0.001
	4.0	5	0.057 ± 0.003
	7.5	5	0.052 ± 0.006
	15.0	5	0.047 ± 0.004
EAST1 17-2 traité avec la PDI	2.5	5	0.054 ± 0.002
	5.0	5	0.055 ± 0.003
EAST1 O42	1.5	4	0.057 ± 0.001
	2.0	5	0.055 ± 0.003
	4.0	5	0.055 ± 0.001
	7.5	4	0.059 ± 0.003
	15.0	5	0.052 ± 0.003
EAST1 O42 traité avec la PDI	2.5	5	0.055 ± 0.003
	5.0	5	0.055 ± 0.002

Conclusion

Les travaux effectués au cours de ce projet de maîtrise ont permis la mise au point d'une nouvelle méthode de purification des variants 17-2 et O42 de la toxine EAST1, en se basant sur la méthode décrite par Ménard *et al.* (2004). Cette nouvelle méthode permet d'augmenter la quantité de toxine EAST1 purifiée. Ménard *et al.* (2004) rapportent obtenir 0.29 mg de toxine EAST1 pure pour 1 litre de bouillon de culture. Les modifications apportées au protocole nous permettent d'obtenir respectivement 10 mg de toxine EAST1 O42 et 4.5mg de toxine EAST1 17-2 par litre de bouillon de culture. La nouvelle méthode permet aussi l'obtention de toxine prête à être utilisée après 4 jours alors que la technique de Ménard *et al.* (2004) demandait 6 jours.

Suite à la purification à homogénéité des deux variants de EAST1, nous avons déterminé leur toxicité à l'aide du test des souriceaux (*Suckling mouse assay*) et des chambres de Ussing. Ménard *et al.* (2004) avaient soulevé un doute sur l'intégrité des ponts disulfures de la toxine suite à l'étape de chromatographie. Nous avons donc utilisé, parallèlement aux échantillons originaux, la toxine EAST1 (O42 et 17-2) préalablement traitée à l'aide de PDI (*protein-disulfide isomerase*) une enzyme facilitant la formation des ponts disulfures.

En continuité à ce projet, il serait intéressant de produire la toxine en utilisant un moyen de purification ne nécessitant pas l'utilisation de glutathione ou autre produit pouvant interférer avec la formation de ponts disulfures. On pourrait, par exemple, produire une protéine de fusion contenant une chaîne histidine pouvant être purifiée à l'aide d'une colonne au nickel. Il est maintenant possible de purifier la toxine EAST1 en quantité suffisante pour faire des tests de conformation et de spectrométrie de masse, pour tous les variants connus. Il serait aussi intéressant de rechercher de nouveaux variants de EAST1, à l'aide d'isolats humains, porcins et bovins, de les

purifier et de comparer leurs activités dans le modèle des chambres de Ussing, en utilisant les cellules T84.

Nous espérons que cette nouvelle technique de purification de EAST1 ainsi que le modèle des chambres de Ussing permettront d'approfondir notre connaissance de la toxine EAST1 ainsi que son rôle dans la pathogénéicité des *E. coli*.

Références

1. **Aimoto, S., T. Takao, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Takeda, Y. Takeda, and T. Miwatani.** 1982. Amino-acid sequence of a heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* **129**:257-63.
2. **Bacciu, D., G. Falchi, A. Spazziani, L. Bossi, G. Marogna, G. S. Leori, S. Rubino, and S. Uzzau.** 2004. Transposition of the heat-stable toxin *astA* gene into a gifsy-2-related prophage of *Salmonella enterica* serovar Abortusovis. *J Bacteriol* **186**:4568-74.
3. **Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother, and J. Harel.** 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol* **41**:2113-25.
4. **Berberov, E. M., Y. Zhou, D. H. Francis, M. A. Scott, S. D. Kachman, and R. A. Moxley.** 2004. Relative importance of heat-labile enterotoxin in the causation of severe diarrheal disease in the gnotobiotic piglet model by a strain of enterotoxigenic *Escherichia coli* that produces multiple enterotoxins. *Infect Immun* **72**:3914-24.
5. **Bertin, Y., C. Martin, J. P. Girardeau, P. Pohl, and M. Contrepolis.** 1998. Association of genes encoding P fimbriae, CS31A antigen and EAST 1 toxin among CNF1-producing *Escherichia coli* strains from cattle with septicemia and diarrhea. *FEMS Microbiol Lett* **162**:235-9.
6. **Blanco, M., S. Schumacher, T. Tasara, C. Zweifel, J. E. Blanco, G. Dahbi, J. Blanco, and R. Stephan.** 2005. Serotypes, intimin variants and other virulence factors of *eae* positive *Escherichia coli* strains isolated from healthy cattle in Switzerland. Identification of a new intimin variant gene (*eae-eta2*). *BMC Microbiol* **5**:23.
7. **Bouzari, S., A. Jafari, A. Azizi, M. Oloomi, and J. P. Nataro.** 2001. Short report: characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from Iranian children. *Am J Trop Med Hyg* **65**:13-4.
8. **Cookson, A. L., C. M. Hayes, G. R. Pearson, J. M. Roe, A. D. Wales, and M. J. Woodward.** 2002. Isolation from a sheep of an attaching and effacing *Escherichia coli* O115:H- with a novel combination of virulence factors. *J Med Microbiol* **51**:1041-9.
9. **Currie, M. G., K. F. Fok, J. Kato, R. J. Moore, F. K. Hamra, K. L. Duffin, and C. E. Smith.** 1992. Guanylin: an endogenous activator of intestinal guanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:947-51.
10. **Czeczulin, J. R., T. S. Whittam, I. R. Henderson, F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 1999. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**:2692-9.
11. **Dean, A. G., Y. C. Ching, R. G. Williams, and L. B. Harden.** 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu. *J Infect Dis* **125**:407-11.
12. **Di Martino, P., Y. Bertin, J. P. Girardeau, V. Livrelli, B. Joly, and A. Darfeuille-Michaud.** 1995. Molecular characterization and adhesive properties of CF29K, an adhesin of *Klebsiella pneumoniae* strains involved in nosocomial infections. *Infect Immun* **63**:4336-44.

13. **Elias, W. P., Jr., J. R. Czczulin, I. R. Henderson, L. R. Trabulsi, and J. P. Nataro.** 1999. Organization of biogenesis genes for aggregative adherence fimbria II defines a virulence gene cluster in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**:1779-85.
14. **Elias, W. P., A. P. Uber, S. K. Tomita, L. R. Trabulsi, and T. A. Gomes.** 2002. Combinations of putative virulence markers in typical and variant enteroaggregative *Escherichia coli* strains from children with and without diarrhoea. *Epidemiol Infect* **129**:49-55.
15. **Eslava, C., F. Navarro-Garcia, J. R. Czczulin, I. R. Henderson, A. Cravioto, and J. P. Nataro.** 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**:3155-63.
16. **Fasano, A.** 1999. Cellular microbiology: can we learn cell physiology from microorganisms? *Am J Physiol* **276**:C765-76.
17. **Fasano, A.** 2002. Toxins and the gut: role in human disease. *Gut* **50**:III9-14.
18. **Francis, D. H., P. A. Grange, D. H. Zeman, D. R. Baker, R. Sun, and A. K. Erickson.** 1998. Expression of mucin-type glycoprotein K88 receptors strongly correlates with piglet susceptibility to K88(+) enterotoxigenic *Escherichia coli*, but adhesion of this bacterium to brush borders does not. *Infect Immun* **66**:4050-5.
19. **Frydendahl, K.** 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* **85**:169-82.
20. **Frydendahl, K., H. Imberechts, and S. Lehmann.** 2001. Automated 5' nuclease assay for detection of virulence factors in porcine *Escherichia coli*. *Mol Cell Probes* **15**:151-60.
21. **Gascon, J., M. Vargas, D. Schellenberg, H. Urassa, C. Casals, E. Kahigwa, J. J. Aponte, H. Mshinda, and J. Vila.** 2000. Diarrhea in children under 5 years of age from Ifakara, Tanzania: a case-control study. *J Clin Microbiol* **38**:4459-62.
22. **Germani, Y., P. Minssart, M. Vohito, S. Yassibanda, P. Glaziou, D. Hocquet, P. Berthelemy, and J. Morvan.** 1998. Etiologies of acute, persistent, and dysenteric diarrheas in adults in Bangui, Central African Republic, in relation to human immunodeficiency virus serostatus. *Am J Trop Med Hyg* **59**:1008-14.
23. **Giannella, R. A.** 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characteristics of the model. *Infect Immun* **14**:95-9.
24. **Girardeau, J. P., L. Lalioui, A. M. Said, C. De Champs, and C. Le Bouguenec.** 2003. Extended virulence genotype of pathogenic *Escherichia coli* isolates carrying the *afa-8* operon: evidence of similarities between isolates from humans and animals with extraintestinal infections. *J Clin Microbiol* **41**:218-26.
25. **Gonzalez, R., C. Diaz, M. Marino, R. Cloralt, M. Pequenezze, and I. Perez-Schael.** 1997. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with

- localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *J Clin Microbiol* **35**:1103-7.
26. **Greenberg, R. N., M. Hill, J. Crytzer, W. J. Krause, S. L. Eber, F. K. Hamra, and L. R. Forte.** 1997. Comparison of effects of uroguanylin, guanylin, and *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin STa in mouse intestine and kidney: evidence that uroguanylin is an intestinal natriuretic hormone. *J Investig Med* **45**:276-82.
 27. **Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-8.
 28. **Han, D. U., C. Choi, J. Kim, W. S. Cho, H. K. Chung, S. K. Ha, K. Jung, and C. Chae.** 2002. Anti-microbial susceptibility for EAST1 + *Escherichia coli* isolated from diarrheic pigs in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **49**:346-8.
 29. **Hedberg, C. W., S. J. Savarino, J. M. Besser, C. J. Paulus, V. M. Thelen, L. J. Myers, D. N. Cameron, T. J. Barrett, J. B. Kaper, and M. T. Osterholm.** 1997. An outbreak of foodborne illness caused by *Escherichia coli* O39:NM, an agent not fitting into the existing scheme for classifying diarrheogenic *E. coli*. *J Infect Dis* **176**:1625-8.
 30. **Henderson, I. R., S. Hicks, F. Navarro-Garcia, W. P. Elias, A. D. Philips, and J. P. Nataro.** 1999. Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. *Infect Immun* **67**:5338-44.
 31. **Huang, D. B., P. C. Okhuysen, Z. D. Jiang, and H. L. DuPont.** 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. *Am J Gastroenterol* **99**:383-9.
 32. **Itoh, Y., I. Nagano, M. Kunishima, and T. Ezaki.** 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J Clin Microbiol* **35**:2546-50.
 33. **Jiang, Z. D., D. Greenberg, J. P. Nataro, R. Steffen, and H. L. DuPont.** 2002. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J Clin Microbiol* **40**:4185-90.
 34. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-40.
 35. **Lai, X. H., S. Y. Wang, and B. E. Uhlin.** 1999. Expression of cytotoxicity by potential pathogens in the standard *Escherichia coli* collection of reference (ECOR) strains. *Microbiology* **145**:3295-303.
 36. **Law, D., and H. Chart.** 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Appl Microbiol* **84**:685-97.
 37. **Lopes, L. M., S. H. Fabbricotti, A. J. Ferreira, M. A. Kato, J. Michalski, and I. C. Scaletsky.** 2005. Heterogeneity among strains of diffusely adherent *Escherichia coli* isolated in Brazil. *J Clin Microbiol* **43**:1968-72.

38. **Makino, S., H. Asakura, T. Shirahata, T. Ikeda, K. Takeshi, K. Arai, M. Nagasawa, T. Abe, and T. Sadamoto.** 1999. Molecular epidemiological study of a mass outbreak caused by enteropathogenic *Escherichia coli* O157:H45. *Microbiol Immunol* **43**:381-4.
39. **Menard, L. P., and J. D. Dubreuil.** 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* **28**:43-60.
40. **Menard, L. P., J. G. Lussier, F. Lepine, C. Paiva de Sousa, and J. D. Dubreuil.** 2004. Expression, purification, and biochemical characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1. *Protein Expr Purif* **33**:223-31.
41. **Monteiro-Neto, V., L. C. Campos, A. J. Ferreira, T. A. Gomes, and L. R. Trabulsi.** 1997. Virulence properties of *Escherichia coli* O111:H12 strains. *FEMS Microbiol Lett* **146**:123-8.
42. **Morabito, S., H. Karch, P. Mariani-Kurkdjian, H. Schmidt, F. Minelli, E. Bingen, and A. Caprioli.** 1998. Enteroaggregative, Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O111:H2 associated with an outbreak of hemolytic-uremic syndrome. *J Clin Microbiol* **36**:840-2.
43. **Nataro, J. P., Y. Deng, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, and C. O. Tacket.** 1995. Heterogeneity of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence demonstrated in volunteers. *J Infect Dis* **171**:465-8.
44. **Nataro, J. P., S. Hicks, A. D. Phillips, P. A. Vial, and C. L. Sears.** 1996. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun* **64**:4761-8.
45. **Nataro, J. P., T. Steiner, and R. L. Guerrant.** 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **4**:251-61.
46. **Nataro, J. P., D. Yikang, J. A. Giron, S. J. Savarino, M. H. Kothary, and R. Hall.** 1993. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. *Infect Immun* **61**:1126-31.
47. **Navarro-Garcia, F., C. Eslava, J. M. Villaseca, R. Lopez-Revilla, J. R. Czeuczulin, S. Srinivas, J. P. Nataro, and A. Cravioto.** 1998. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**:3149-54.
48. **Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
49. **Nguyen Thi, P. L., S. Yassibanda, A. Aidara, C. Le Bouguenec, and Y. Germani.** 2003. Enteropathogenic *Klebsiella pneumoniae* HIV-infected adults, Africa. *Emerg Infect Dis* **9**:135-7.
50. **Nishikawa, Y., Z. Zhou, A. Hase, J. Ogasawara, T. Kitase, N. Abe, H. Nakamura, T. Wada, E. Ishii, and K. Haruki.** 2002. Diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from stools of sporadic cases of diarrheal illness in Osaka City, Japan between 1997 and 2000: prevalence of

- enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 gene-possessing *E. coli*. Jpn J Infect Dis **55**:183-90.
51. **Noamani, B. N., J. M. Fairbrother, and C. L. Gyles.** 2003. Virulence genes of O149 enterotoxigenic *Escherichia coli* from outbreaks of postweaning diarrhea in pigs. Vet Microbiol **97**:87-101.
 52. **Okeke, I. N., A. Lamikanra, J. Czeczulin, F. Dubovsky, J. B. Kaper, and J. P. Nataro.** 2000. Heterogeneous virulence of enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from children in Southwest Nigeria. J Infect Dis **181**:252-60.
 53. **Osek, J.** 2003. Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1) gene and its relationship with fimbrial and enterotoxin markers in *E. coli* isolates from pigs with diarrhoea. Vet Microbiol **91**:65-72.
 54. **Paiva de Sousa, C., and J. D. Dubreuil.** 2001. Distribution and expression of the *astA* gene (EAST1 toxin) in *Escherichia coli* and *Salmonella*. Int J Med Microbiol **289**:15-20.
 55. **Piva, I. C., A. L. Pereira, L. R. Ferraz, R. S. Silva, A. C. Vieira, J. E. Blanco, M. Blanco, J. Blanco, and L. G. Giugliano.** 2003. Virulence markers of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children and adults with diarrhea in Brasilia, Brazil. J Clin Microbiol **41**:1827-32.
 56. **Rich, C., S. Favre-Bonte, F. Sapena, B. Joly, and C. Forestier.** 1999. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates. FEMS Microbiol Lett **173**:55-61.
 57. **Robins-Browne, R. M., A. M. Bordun, M. Tauschek, V. R. Bennett-Wood, J. Russell, F. Oppedisano, N. A. Lister, K. A. Bettelheim, C. K. Fairley, M. I. Sinclair, and M. E. Hellard.** 2004. *Escherichia coli* and community-acquired gastroenteritis, Melbourne, Australia. Emerg Infect Dis **10**:1797-805.
 58. **Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine.** 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an *in vitro* rabbit intestinal model. J Clin Invest **87**:1450-5.
 59. **Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry.** 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. Proc Natl Acad Sci U S A **90**:3093-7.
 60. **Savarino, S. J., A. McVeigh, J. Watson, A. Cravioto, J. Molina, P. Echeverria, M. K. Bhan, M. M. Levine, and A. Fasano.** 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. J Infect Dis **173**:1019-22.
 61. **Schultsz, C., J. van den Ende, F. Cobelens, T. Vervoort, A. van Gompel, J. C. Wetsteyn, and J. Dankert.** 2000. Diarrheagenic *Escherichia coli* and acute and persistent diarrhea in returned travelers. J Clin Microbiol **38**:3550-4.
 62. **Smith, H. R., T. Cheasty, and B. Rowe.** 1997. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. Lancet **350**:814-5.

63. **Sousa, C. P.** 2003. East1 and its presence in a changing microbial world. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* **9**.
64. **Stephan, R., N. Borel, C. Zweifel, M. Blanco, and J. E. Blanco.** 2004. First isolation and further characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) O157:H45 strains from cattle. *BMC Microbiol* **4**:10.
65. **Stephan, R., and F. Untermann.** 1999. Virulence factors and phenotypical traits of verotoxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic human carriers. *J Clin Microbiol* **37**:1570-2.
66. **Takao, T., T. Hitouji, S. Aimoto, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Takeda, Y. Takeda, and T. Miwatani.** 1983. Amino acid sequence of a heat-stable enterotoxin isolated from enterotoxigenic *Escherichia coli* strain 18D. *FEBS Lett* **152**:1-5.
67. **Toshima, H., E. Uenaka, Y. Bi, H. Nakamura, J. Ogasawara, A. Hase, Y. Kamata, and Y. Nishikawa.** 2004. Detection and isolation of *Escherichia coli* with a coding gene for enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 from food and comparison with fecal isolates. *J Food Prot* **67**:2117-22.
68. **Tsai, C. C., S. Y. Chen, and H. Y. Tsen.** 2003. Screening the enteroaggregative *Escherichia coli* activity and detection of the *aggA*, *aafA*, and *astA* genes with novel PCR primers for the *Escherichia coli* isolates from diarrhea cases in Taiwan. *Diagn Microbiol Infect Dis* **46**:159-65.
69. **Vila, J., A. Gene, M. Vargas, J. Gascon, C. Latorre, and M. T. Jimenez de Anta.** 1998. A case-control study of diarrhoea in children caused by *Escherichia coli* producing heat-stable enterotoxin (EAST-1). *J Med Microbiol* **47**:889-91.
70. **Vila, J., M. Vargas, I. R. Henderson, J. Gascon, and J. P. Nataro.** 2000. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. *J Infect Dis* **182**:1780-3.
71. **Vu-Khac, H., E. Holoda, and E. Pilipcinec.** 2004. Distribution of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic piglets in the Slovak Republic. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:343-7.
72. **Wanke, C. A., H. Mayer, R. Weber, R. Zbinden, D. A. Watson, and D. Acheson.** 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. *J Infect Dis* **178**:185-90.
73. **Whipp, S. C.** 1990. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect Immun* **58**:930-4.
74. **Yamamoto, T., and I. Taneike.** 2000. The sequences of enterohemorrhagic *Escherichia coli* and *Yersinia pestis* that are homologous to the enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin gene: cross-species transfer in evolution. *FEBS Lett* **472**:22-6.

75. **Yamamoto, T., N. Wakisaka, T. Nakae, T. Kamano, O. Serichantalergs, and P. Echeverria.** 1996. Characterization of a novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristics of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. *Infect Immun* **64**:3694-702.
76. **Yamamoto, T., N. Wakisaka, F. Sato, and A. Kato.** 1997. Comparison of the nucleotide sequence of enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 genes among diarrhea-associated *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **147**:89-95.
77. **Yatsuyanagi, J., S. Saito, Y. Miyajima, K. Amano, and K. Enomoto.** 2003. Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains harboring the *astA* gene that were associated with a waterborne outbreak of diarrhea in Japan. *J Clin Microbiol* **41**:2033-9.
78. **Zamboni, A., S. H. Fabbricotti, U. Fagundes-Neto, and I. C. Scaletsky.** 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors are found to be associated with infantile diarrhea in Brazil. *J Clin Microbiol* **42**:1058-63.
79. **Zhou, Z., J. Ogasawara, Y. Nishikawa, Y. Seto, A. Helander, A. Hase, N. Iritani, H. Nakamura, K. Arikawa, A. Kai, Y. Kamata, H. Hoshi, and K. Haruki.** 2002. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). *Epidemiol Infect* **128**:363-71.

Annexe I

Annexe I. Résultats du test des souriceaux nouveau-nés

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 10h10

Heure d'euthanasie : 13h10

Volume échantillon : 15 μ L

Échantillon: Témoin - : (eau + anti-trypsine (20mg/mL) et 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.07	1.51	0.046
2	0.12	2.01	0.060
3	0.13	2.05	0.063
4	0.12	1.94	0.062
5	0.13	2.02	0.064

Souriceau 1 : DCD, mais pas cyanosé.

Moyenne ratio (I/C) : 0.059

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 11h04

Heure d'euthanasie : 14h00

Volume échantillon : 15 μ L

Échantillon: ~0.3 un. STa (anti-trypsine (20mg/mL) et 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.09	1.55	0.058
2	0.09	1.63	0.055
3	0.09	1.51	0.060
4	0.07	1.53	0.046
5	0.08	1.52	0.053

Moyenne ratio : 0.054

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 11h12

Heure d'euthanasie : 14h15

volume échantillon : 15 μ L

Échantillon: ~1.5 un. STa (anti-trypsine (20mg/mL) et 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.09	1.44	0.063
2	0.11	1.61	0.068
3	0.11	1.59	0.069
4	0.12	1.62	0.074
5	0.09	1.56	0.058

moyenne ratio : 0.054

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 15h12

Heure d'euthanasie : 18h10

Volume éch.: 10 μ L

Échantillon: ~5un. STa (avec 40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)
témoin positif

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.32	1.77	0.181
2	0.18	1.93	0.093
3	0.20	2.12	0.094
4	0.28	2.17	0.129
5	0.22	1.93	0.114

moyenne ratio : 0.122

Date: 05-11-18

Heure inoculation: 9h42

Heure d'euthanasie : 12h40

Volume éch.:10 μ L

Échantillon: « Master Mix » PDI (avec 40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans) Témoin négatif pour toxine traitée au PDI

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.16	2.89	0.055
2	0.14	2.41	0.058
3	0.14	2.30	0.061
4	0.09	1.67	0.054
5	0.12	1.95	0.062

moyenne ratio : 0.058

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 10h25

Heure d'euthanasie : 13h25

volume éch. : 15 μ L

Échantillon: 1.5 μ g EAST1 17-2 (anti-trypsine (20mg/mL) et 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.12	2.22	0.054
2	0.14	2.23	0.063
3	0.12	1.93	0.062
4	0.12	2.08	0.058
5	0.11	1.96	0.056

moyenne ratio : 0.059

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 10h30

Heure d'euthanasie : 13h30

volume éch : 15 μ L

Échantillon: 7.5 μ g EAST1 17-2 (anti-trypsine (20mg/mL) et 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.06	1.94	0.031
2	0.13	1.88	0.069
3	0.12	2.02	0.059
4	0.11	1.95	0.056
5	0.09	2.09	0.043

souriceaux 1 à 4 DCD, cyanosés + et rigides après 3h

moyenne ratio : 0.052

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 10h35

Heure d'euthanasie : 13h35

volume éch. : 15 μ L

Échantillon: 15 μ g EAST1 17-2 (anti-trypsine (20mg/mL) et 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.06	1.87	0.032
2	0.10	1.95	0.051
3	0.10	2.00	0.050
4	0.08	1.90	0.042
5	0.12	2.00	0.060

souriceaux 1 et 2 : DCD (11h20 et 12h31) bleus +++ et rigides

moyenne ratio : 0.047

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 14h50

Heure d'euthanasie : 17h50

volume éch. : 15 μ L

Échantillon: 2 μ g EAST1 17-2 (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.09	1.97	0.045
2	0.10	2.08	0.048
3	0.11	2.24	0.049
4	0.09	1.99	0.045
5	0.10	2.18	0.046

moyenne ratio : 0.047

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 14h55

Heure d'euthanasie : 17h55

volume 15 μ L

Échantillon: 4 μ g EAST1 17-2 (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.10	1.86	0.053
2	0.11	2.08	0.053
3	0.11	1.90	0.058
4	0.09	1.80	0.050
5	0.12	1.68	0.071

moyenne ratio : 0.057

Date: 05-11-18

Heure inoculation: 9h20

Heure d'euthanasie : 12h20

volume 10 μ L

Échantillon: 2.5 μ g EAST1 17-2 PDI (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.13	2.68	0.049
2	0.12	2.10	0.057
3	0.11	2.15	0.051
4	0.11	1.90	0.058
5	0.11	1.95	0.056

moyenne ratio : 0.054

Date: 05-11-18

Heure inoculation: 9h30

Heure d'euthanasie : 12h30

volume : 10 μ L

Échantillon: 5 μ g EAST1 17-2 PDI (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.13	1.89	0.069
2	0.10	1.93	0.052
3	0.11	1.94	0.057
4	0.09	1.94	0.046
5	0.10	1.92	0.052

moyenne ratio : 0.055

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 10h42

Heure d'euthanasie : 13h40

vaolume : 15 μ L

Échantillon: 1.5 μ g EAST1 O42 (avec 20mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.10	1.89	0.053
2	0.10	1.75	0.057
3	0.11	1.90	0.058
4	0.10	1.85	0.054
5	0.11	1.90	0.058

souriceau 1 : régurgitation de l'éch. donc éliminé

moyenne ratio : 0.057

Date : 05-11-17

Heure inoculation : 10h50

Heure d'euthanasie : 13h50

volume : 15 μ L

Échantillon : 7.5 μ g EAST1 O42 (20mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.10	1.98	0.051
2	0.10	1.73	0.058
3	0.12	2.04	0.059
4	0.12	1.83	0.066
5	0.09	1.86	0.048

souriceaux 1 à 4 : DCD 12h31 cyanosés + et rigides

souriceau 5 : régurgitation de l'éch. donc éliminé

moyenne ratio : 0.059

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 11h00

Heure d'euthanasie : 14h00

volume : 15 μ L

Échantillon: 15 μ g EAST1 O42 (20mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.09	1.65	0.055
2	0.09	1.52	0.059
3	0.07	1.64	0.043
4	0.09	1.53	0.059
5	0.07	1.55	0.045

souriceaux 1 à 5 : DCD 12h31 cyanosés +++

moyenne ratio : 0.052

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 15h03

Heure d'euthanasie : 18h00

volume : 15 μ L

Échantillon: 2 μ g EAST1 O42 (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.09	1.91	0.047
2	0.11	2.14	0.051
3	0.10	1.59	0.067
4	0.10	1.75	0.057
5	0.10	1.87	0.053

moyenne ratio : 0.055

Date: 05-11-17

Heure inoculation: 15h06

Heure d'euthanasie : 18h10

volume : 15 μ L

Échantillon: 4 μ g EAST1 O42 (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.13	2.39	0.054
2	0.13	2.27	0.057
3	0.12	2.18	0.055
4	0.12	2.28	0.053
5	0.07	1.24	0.056

moyenne ratio : 0.055

Date: 05-11-18

Heure inoculation: 9h25

Heure d'euthanasie : 12h25

volume : 10 μ L

Échantillon: 2.5 μ g EAST1 O42 PDI (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.10	2.08	0.048
2	0.12	2.52	0.048
3	0.11	1.92	0.057
4	0.12	1.88	0.064
5	0.12	2.14	0.056

moyenne ratio : 0.055

Date: 05-11-18

Heure inoculation: 9h36

Heure d'euthanasie : 12h40

Volume éch.: 10 μ L

Échantillon: 5 μ g EAST1 O42 PDI (40mg/mL anti-trypsine + 2% bleu Evans)

Souriceau	Poids intestin	Poids carcasse	ration I/C
1	0.15	2.78	0.054
2	0.15	2.67	0.056
3	0.14	2.68	0.052
4	0.16	2.45	0.065
5	0.14	2.44	0.057

moyenne ratio : 0.057

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Veilleux, Sophie		
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Sophie Veilleux et J. Daniel Dubreuil	
Titre Purification of two variants of the enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> heat-stable toxin 1 (EAST1) and evaluation of their toxicity	
Revue <i>INFECTION AND IMMUNITY</i>	Date de publication <i>EN PRÉPARATION</i>

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Dr. J. Daniel Dubreuil		Date <i>30/03/2006</i>
Coauteur		Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Veilleux, Sophie		
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Sophie Veilleux et J. Daniel Dubreuil	
Titre Presence of <i>Escherichia coli</i> carrying the EAST1 toxin gene in farm animals	
Revue Veterinary research	Date de publication 2006-01

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que (nom de l'étudiant) inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre (titre du mémoire).</i>		
Coauteur Dr. J. Daniel Dubreuil		Date 30/03/2006
Coauteur		Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation des mémoires de maîtrise et des thèses de doctorat, mars 2001

PERMISSION DE L'ÉDITEUR D'UNE REVUE OU D'UN LIVRE¹

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Sophie Veilleux		
M.Sc.	Sciences vétérinaires	Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Sophie Veilleux et Daniel Dubreuil		
Presence of <i>Escherichia coli</i> carrying the EAST1 toxin gene in farm animals		
37	3-13	Janvier - Février 2006

IDENTIFICATION DE LA REVUE OU DU LIVRE

Veterinary Research	
Veterinary Research INRA, Virologie et Immunologie Moléculaires Domaine de Vilvert 78352 Jouy-en-Josas cedex (France)	2006-01-19

DECLARATION DE L'ÉDITEUR

<i>À titre d'éditeur, j'autorise le microfilmage du mémoire et je suis d'accord que Sophie Veilleux inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre : PURIFICATION ET ÉTUDES TOXICOLOGIQUES DES VARIANTS O42 ET 17-2 DE L'ENTÉROTOXINE EAST1 (ENTEROAGGREGATIVE Escherichia coli HEAT-</i>	
EDP Sciences 17, av. du Hoger 91944 Les Ulis Tel. : 01 69 18 75	
	24/1/06

¹Annexe II du Guide de présentation et d'évaluation

