

2m11.2615.7

Université de Montréal

**"Étude d'adhésion et d'invasion
d'*Escherichia coli* sur culture cellulaire"**

par

Lili Béka

**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**

Décembre, 1997

©Lili Béka, 1997



SF
607
U54
1998
V.009

Université de Montréal

"Étude de la relation entre le stress et le système immunitaire"

par

Luc Robitaille

et

Département de psychologie et de neurobiologie
Faculté de médecine vétérinaire

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

Édition: 1997

0311-8448-1997



**Université de Montréal
Faculté des études supérieures**

Ce mémoire intitulé:

**Étude d'adhésion et d'invasion
d'*Escherichia coli* sur culture cellulaire**

présenté par:

Lili Béka

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Dr Khyali R. Mittal	: président rapporteur
Dre Josée Harel	: directrice de recherche
Dr John M. Fairbrother	: membre du jury

Mémoire accepté le: 15.05.1998 **.....**

SOMMAIRE

Escherichia coli est à l'origine d'une grande variété d'infections extra-intestinales. Certains déterminants de virulence contribuant à la pathogénicité des souches de *E. coli* causant des septicémies sont représentés par les adhésines, faisant souvent partie des fimbriae. Les adhésines retrouvées le plus fréquemment chez les souches de *E. coli* causant des infections extra-intestinales sont les fimbriae de la famille P et de la famille S. Chez l'humain, les fimbriae P sont associés à des souches de *E. coli* retrouvées dans les infections du tractus urinaire et les bactériémies; les fimbriae S et F1C (famille S) sont reliés étroitement, et se trouvent fréquemment chez les souches isolées de cas de méningite du nouveau-né, de septicémies, et parfois parmi les souches uropathogènes.

Les fimbriae permettent l'adhérence spécifique à des récepteurs présents à la surface des cellules de l'hôte. Le fimbriae F165, formé du complexe fimbriaire F165₁ et F165₂, est produit par des souches de *E. coli* O115:K"V165":F165 isolées de porcelets atteints de septicémie. Le fimbriae F165₁ appartient à la famille P, et le fimbriae F165₂ est homologue au fimbriae F1C.

Les souches possédant les fimbriae F165₁ et F165₂ induisent une septicémie. L'infection expérimentale de ces souches montre leur localisation extra-intestinale et leur adhérence à certains tissus. Ces souches pourraient traverser la membrane épithéliale intestinale et gagner la circulation générale. Pour étudier le rôle des fimbriae F165₁ et F165₂ dans les étapes d'adhésion et d'invasion cellulaire, on a utilisé un modèle de culture cellulaire. L'adhérence ainsi que l'invasion de souches sauvages et recombinantes exprimant ou non ces fimbriae ont été testées *in vitro* sur des cellules épithéliales MDCK-II, LLC-PK1, et HeLa. L'adhérence bactérienne n'a été observée que sur les cellules MDCK-II et LLC-PK1.

L'adhérence des souches possédant le fimbriae F165₁ sur les cellules épithéliales MDCK-II est plus importante que l'adhérence de la souche mutante

F165₁-négative M48. Le clone HB101(pCJ7) exprimant F165₁ manifeste une adhérence beaucoup plus marquée que les souches sauvages et que le clone HB101(pYvan) exprimant F165₂. Nos résultats démontrent que le fimbriae F165₁ contribue à l'adhérence *in vitro* des souches de *E. coli* sur les cellules MDCK-II et LLC-PK1. Nous avons auparavant démontré que ce fimbriae joue un rôle dans l'adhérence des organes extra-intestinaux *in vivo*. Dans nos modèles expérimentaux, F165₂ aurait moins d'importance dans l'adhérence *in vitro*. A l'inverse des souches contrôles, les souches F165-positives n'étaient pas invasives.

Quoique le fimbriae F165₁ semble jouer un rôle dans la dissémination de *E. coli* O115:K"V165":F165, le mécanisme par lequel les souches F165-positives se retrouvent dans les organes extra-intestinaux reste à élucider.

TABLE DES MATIÈRES

Identification du Jury	II
Sommaire	III
Liste des tableaux	VIII
Liste des figures	IX
Liste des abréviations	X
Dédicace	XII
Remerciements	XIII
I. Introduction	1
II. Revue de littérature	6
1. <i>Escherichia coli</i> pathogènes	7
1-1. Introduction	7
1-2. Infections intestinales	7
1-2-1. Les ETEC	8
1-2-2. Les EAgEC	9
1-2-3. Les EPEC	9
1-2-4. Les EHEC	11
1-2-5. Les EIEC	12
1-3 Infections extra-intestinales	13
1-3-1. Infections du tractus urinaire (UTI)	13
1-3-2. Méningite à <i>E. coli</i>	14
1-3-3. Septicémie	15

2-	Les fimbriae comme facteurs de virulence de <i>E. coli</i> causant des infections extra-intestinales	16
2-1.	Généralités	16
2-2.	Classification	18
2-3.	Biogénèse	20
2-4.	Génétique	22
2-5.	Régulation	23
3-	Les fimbriae d' <i>E. coli</i> causant des infections extra-intestinales	23
3-1.	Fimbriae type 1	23
3-2.	Fimbriae P	25
3-2-1.	Structure et génétique	25
3-2-2.	Récepteurs et adhésion	26
3-2-3.	Tropisme tissulaire et pathogénie	27
3-3.	Fimbriae S et F1C	27
3-3-1.	Structure et génétique	28
3-3-2.	Récepteurs et adhésion	29
3-3-3.	Tropisme tissulaire et pathogénie	30
3-4.	Fimbriae F165	30
3-4-1.	F165 ₁	31
3-4-2.	F165 ₂	32
4-	Autres facteurs de virulence de <i>E. coli</i> causant des infections extra-intestinales	33
4-1.	Le LPS	33
4-2.	Hémolysine	34
4-3.	Facteur nécrosant cytotoxique (CNF)	35

4-4. Antigène capsulaire K	36
4-5. Aéro bactéine	37
4-6. Colicine V	37
4-7. Protéines de la membrane externe	38
5- Ilôts de pathogénicité	39
5-1. Définition	39
5-2. Caractéristiques	40
6- Adhérence et invasion	41
6-1. Adhérence	41
6-2. Invasion	44
III. Matériels, méthodes et résultats	47
IV. Discussion et conclusion	71
V. Annexes	76
VI. Bibliographie	80

LISTE DES TABLEAUX

III.	ARTICLE		
	Table 1.	Bacterial strains used in this study.....	58
	Table 2.	Bacterial invasion of and adherence to MDCK-II monolayers	62

LISTE DES FIGURES

II. REVUE DE LITTÉRATURE	
Figure 1. Organisation génétique de l'opéron <i>pap</i>	21
 III. ARTICLE	
Figure 1a. Immunoblotting of fimbrial extracts with anti-F165 ₁ antiserum	59
Figure 1b. Immunoblotting of fimbrial extracts with anti-F165 ₂ antiserum	60
Figure 2. Adherence of <i>E. coli</i> on MDCK-II and LLC-PK1 monolayers after 2 hour incubation (bacteria/cell: 100:1)	61
 V. ANNEXES	
ANNEXE 1. Test d'adhésion et d'invasion des souches bactériennes utilisées	77
ANNEXE 2. Adhérence bactérienne aux cellules MDCK-II	78
ANNEXE 3. Courbes d'adhérence de <i>E. coli</i> 5131 sur MDCK-II à intervalles de temps différents en fonction des différentes concentrations bactériennes	79

LISTE DES ABRÉVIATIONS

A/E:	attaching and effacing
ADN:	acide désoxyribonucléique
AEEC:	attaching and effacing <i>E. coli</i>
AFAI:	adhésine afimbriaire
AIDA:	adhesin involved in diffuse adherence
ARN:	acide ribonucléique
BMEC:	brain microvascular endothelial cell
CFA:	colonization factor antigen
CNF:	cytotoxin necrotizing factor
CRP:	catabolite repressor protein
eae:	<i>E. coli</i> attaching and effacing
EAF:	EPEC adherence factor
EAggEC:	entero-aggregative <i>E. coli</i>
EAST:	entero-aggregative ST-like toxin
EIEC:	entero-invasive <i>E. coli</i>
ELISA:	enzyme linked immunoabsorbant assay
EHEC:	enterohaemorrhagic <i>E. coli</i>
EPEC:	enteropathogenic <i>E. coli</i>
ETEC:	enterotoxigenic <i>E. coli</i>
Hly:	hemolysin
kb:	kilo paire de bases
kDa:	kilo Dalton
LBP:	LPS binding protein
LEE:	locus of enterocyte effacement
LPS:	lipopolysaccharide
LT:	thermolabile toxin
MAC:	membrane attack complex

Mda:	megadalton
MR:	mannose resistant
MS:	mannose sensitive
OMP:	outer membrane protein
ORF:	open reading frame
PAIS:	pathogenicity island
PCR:	polymerase chain reaction
RTX:	repeats in toxin
SHU:	syndrome hémolytique urémique
SLT:	shiga-like toxin
ST:	thermostable toxin
TLC:	thin layer chromatography
UTI:	urinary tract infection
VT:	verotoxin

A mon mari, pour son encouragement et son soutien,
à ma famille qui m'a supporté de loin, et à mes amis.

REMERCIEMENT

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail, et plus particulièrement:

- Dre Josée Harel, pour son support scientifique et son aide à la préparation de ce document,

- Pierre Challier et Seyed Ali Pourbakhsh, pour leur collaboration et précieux conseils,

- Dominique Dugourd, pour ses conseils et sa disponibilité,

- Céline Forget et Clarisse Desautels, pour leur aide technique.

I. INTRODUCTION

Escherichia coli est une bactérie Gram négative, anaérobie facultative, appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. La plupart des souches de *E. coli* font partie de la flore normale du tube digestif de l'homme et de l'animal. Mais certaines souches sont à l'origine de plusieurs maladies. Elles sont classées habituellement en deux grandes catégories: les infections intestinales, et les infections extra-intestinales (Levine, 1987; Orskov & Orskov, 1985). Les infections intestinales sont classées en 5 catégories selon les facteurs de virulence qu'elles possèdent, les lésions et maladies qu'elles induisent (Sussman, 1985). Elles regroupent les souches entérotoxigènes (ETEC), les souches entéroaggrégatives (EAaggEC), les souches entéropathogènes (EPEC), les souches entérohémorragiques (EHEC), et les souches entéroinvasives (EIEC). Les infections intestinales entraînent particulièrement des diarrhées, en plus d'autres symptômes. Les infections extra-intestinales se présentent de différentes manières. Les souches responsables doivent être capables de traverser la barrière épithéliale, résister à la phagocytose et à l'effet bactéricide du sérum, et survivre dans un milieu dépourvu de fer. De plus, elles doivent être capables de survivre à l'intérieur d'un habitat particulier comme le tractus urinaire, ou le système sanguin. Ces milieux sont très variés, et les bactéries doivent s'adapter à un environnement où le pH, l'osmolarité, la température jouent un rôle primordial.

En général, on distingue chez les souches extra-intestinales celles qui sont responsables d'infections du tractus urinaire (UTI), de méningite, et de septicémie (Orskov & Orskov, 1985). Les UTI représentent les infections extra-intestinales à *E. coli* les plus communes chez l'homme (Donnenberg & Welch, 1996). Elles se manifestent soit par une bactériurie asymptomatique, soit par une cystite, ou alors une pyélonéphrite. Les adhésines les plus importantes dans les UTI sont portées par les fimbriae P (Salyers & Whitt, 1994). D'autres facteurs de virulence sont souvent associés, comme le LPS, les exotoxines, le système d'acquisition du fer.

E. coli est une cause fréquente de méningite chez les nouveaux-nés (Sussman, 1985). Les souches de *E. coli* K1 sont reconnues comme responsables de

la méningite du nouveau-né. Les fimbriae S sont souvent associés à ces infections néo-natales. Les facteurs de virulence impliqués dans les cas de septicémies sont peu connus chez l'homme, mais les facteurs de l'hôte joueraient aussi un rôle important dans la pathogénie. Chez les animaux, les infections extra-intestinales sont associées à des infections telles que la colibacillose systémique (colisepticémie, arthrite, méningite), les mammites bovines, et les infections du tractus urinaire chez le chien et le chat (Garcia *et al.*, 1988; Morris & Sojka, 1985; Sussman, 1985). Chez la volaille, la colibacillose est la cause principale de morbidité et de mortalité, caractérisée par des troubles respiratoires suivie d'une infection généralisée (Gross, 1994).

La pathogénicité des souches de *E. coli* causant des infections extra-intestinales est complexe et multi-factorielle. Plusieurs déterminants de virulence sont associés à ces souches, comme les adhésines, l'antigène capsulaire, l'aérobactine ou le lipopolysaccharide (LPS). Les adhésines sont le plus souvent associées à des fimbriae. Les fimbriae sont des filaments protéiques, généralement constitués d'une même sous-unité de protéine, qui confèrent la spécificité antigénique au fimbriae et qui sont dans certains cas associées à quelques copies de sous-unités mineures, comprenant l'adhésine (Smyth, Marron & Smith, 1994). Dans les infections extra-intestinales, l'adhésion de la bactérie aux tissus de l'hôte est une des premières étapes dans le mécanisme de pathogénicité. Le récepteur localisé sur les cellules eucaryotes est généralement de nature glucidique. Les fimbriae d'*E. coli* extra-intestinal sont essentiellement représentés par les fimbriae de type 1, les fimbriae de la famille P, S et F1C. Les fimbriae P sont associés à des souches de *E. coli* retrouvées dans les infections sévères du tractus urinaire et les bactériémies humaines, et les infections respiratoires et septicémies aviaires. Ils sont aussi associés aux septicémies du veau et du porcelet (Dozois, Pourbakhsh & Fairbrother, 1995; Fairbrother *et al.*, 1993), avec la présence d'une adhésine de structure légèrement différente. La sous-unité majeure PapA des fimbriae P constitue le corps du fimbriae. L'adhésine PapG, qui se trouve à l'extrémité de la fibrille, détermine la spécificité de liaison et se lie à la portion Gal-Gal des glycolipides des cellules eucaryotes (Lund *et al.*, 1987). Les fimbriae S et F1C sont reliés

étroitement, et partagent une structure génétique commune. Les fimbriae S se trouvent chez les souches isolées de cas de méningite du nouveau-né, de septicémies et parfois chez des souches uropathogènes (Johnson, 1991). Les fimbriae S se lient aux récepteurs contenant les portions acide sialique. Les fimbriae F1C sont le plus souvent associés à des souches uropathogènes, et n'ont pas de propriété hémagglutinante, contrairement au fimbriae S.

Un autre fimbriae de *E. coli* extra-intestinal, le fimbriae F165, a été identifié sur des souches de *E. coli* O115 causant des septicémies chez des porcelets (Fairbrother, Larivière & Lallier, 1986). Le fimbriae F165 est un complexe fimbriaire, qui donne deux sous-unités protéiques distinctes après purification, qu'on a désigné sous le nom de fimbriae F165₁ et F165₂. Ces deux fimbriae sont sérologiquement et génétiquement distincts (Fairbrother *et al.*, 1988a; Harel *et al.*, 1995). La sous-unité majeure du fimbriae F165₁ a un poids moléculaire de 18,5 kDa. Ce fimbriae appartient à la classe des fimbriae P, mais possède une adhésine similaire à Prs du fimbriae F13. Le poids moléculaire de la sous-unité majeure du fimbriae F165₂ est de 17,2 kDa (Harel *et al.*, 1992a). Cette protéine a une forte homologie avec F1C. L'opéron *f165₂* appartient à la famille des fimbriae S et est homologue à l'opéron *foc*.

Pour évaluer le rôle des fimbriae F165₁ dans les infections, des mutants négatives pour ce fimbriae ont été construits. Il semble que la présence de ce fimbriae est indispensable pour une pathogénicité complète chez des porcelets gnotobiotiques, et qu'il jouerait un rôle dans l'adhérence extra-intestinale des tissus de l'hôte. Pour l'instant, le rôle du fimbriae F165₂ n'est pas encore élucidé.

Le rôle des fimbriae impliqués dans la pathogénie de la septicémie n'est pas très bien compris. Plusieurs travaux utilisent des lignées de culture cellulaire comme modèle pour étudier l'adhérence et l'invasion cellulaire. Dans notre étude, nous avons utilisé les lignées cellulaires MDCK-II et LLC-PK1 pour étudier l'adhérence et l'invasion des souches de *E. coli* 5131 et 4787 de séro groupe O115:K"V165":F165. De même, des mutants obtenus par mutagenèse par *TnphoA* dans les gènes associés avec F165₁, ainsi que des souches recombinantes exprimant les fimbriae F165₁ et F165₂ ont été utilisés. Les souches exprimant le fimbriae

F165₁ et F165₂ sont adhérentes sur les lignées cellulaires MDCK-II et LLC-PK1, dans les conditions expérimentales utilisées. Mais aucun phénotype d'invasion n'a été observé pour ces souches.

II- REVUE DE LITTÉRATURE

1. *Escherichia coli* pathogènes

1-1. Introduction

C'est à la fin du 19^{ème} siècle que la bactérie *Escherichia coli* fut isolée pour la première fois par le médecin allemand Théodor Escherich à partir de fécès de jeunes enfants (Sussman, 1985). Celui-ci démontra son existence comme hôte normal de l'intestin de l'enfant et, pour marquer à la fois ce tropisme et la fréquence de son isolement, l'appela *Bacterium coli commune*, ce que l'on peut traduire par "bactérie commune du colon". C'est en 1919 qu'on lui donna son nom définitif en hommage à Escherich. Ubiquitaire, *E. coli* présente de multiples facettes et forme le taxon bactérien de loin le plus étudié. C'est une bactérie Gram négative qui fait partie de la flore normale du tube digestif de l'homme et de l'animal, et qui constitue souvent l'espèce prédominante parmi les bactéries anaérobies facultatives de la flore fécale. Certaines souches de *E. coli* sont pathogènes et sont à l'origine d'affections diverses qui peuvent causer une grande variété d'infections intestinales et extra-intestinales (Levine, 1987; Sussman, 1985).

1-2. Infections intestinales

Les souches de *E. coli* qui causent des infections intestinales peuvent être réparties en 5 catégories. Leur classification a été faite selon les facteurs de virulence qu'elles possèdent, les lésions et maladies qu'elles induisent (Sussman, 1985). Les sigles utilisés pour la classification (par exemple ETEC) sont généralement réservés aux souches d'origine humaine. Ainsi, pour qualifier les souches isolées d'animaux, certains auteurs vont utiliser le signe correspondant suivi du terme anglo-saxon de "-like", par exemple "ETEC-like" (Milon, 1993). Mais globalement, on retrouve chez les animaux des souches dont les propriétés évoquent étroitement les groupes définis pour les souches humaines. Ici, on utilisera les mêmes sigles indifféremment de l'origine des souches isolées. On distingue:

- les souches entérotoxigènes (ETEC)
- les souches entéroaggrégatives (EAggEC)
- les souches entéro-pathogènes (EPEC)

- les souches entérohémorragiques (EHEC)
- les souches entéroinvasives (EIEC)

1-2-1. Les souches entérotoxigènes (ETEC)

Les souches ETEC ont été mises en évidence à la fin des années 60 chez l'homme, comme étant des agents majeurs de diarrhées avec déshydratation (Hart, Batt & Saunders, 1993; Milon, 1993). Ce sont aussi les agents responsables de la diarrhée du voyageur. La contamination se produit lors d'ingestion d'eau ou d'aliments contaminés. Ces souches ressemblent à *Vibrio cholerae* par leur mécanisme d'action, mais la diarrhée est moins sévère, quoiqu'elle peut aussi être fatale. En effet, la diarrhée provoquée par les ETEC est une cause majeure de mortalité infantile dans les pays en voie de développement (Salyers & Whitt, 1994). Ces souches sont souvent limitées à un nombre de sérotypes O:H (Orskov & Orskov, 1992). Chez les animaux, les souches ETEC sont responsables de diarrhées néonatales souvent mortelles, accompagnées de déshydratation intense, qui atteint le veau, l'agneau ou le porcelet dans la première semaine de vie (Gaastra & De Graaf, 1982).

Les souches ETEC colonisent l'intestin grêle grâce à des adhésines fimbriaires, et produisent des entérotoxines thermolabile (LT) ou thermostable (ST) qui modifient les flux d'eau et d'ions à travers la barrière épithéliale (Levine, 1987). Les entérotoxines LT font partie de la famille des entérotoxines cytotoxiques, avec la toxine cholérique qui sert de modèle d'étude. Contrairement aux entérotoxines ST, elles sont immunogènes *in vivo* et donnent lieu à des réponses locales humorales (Milon, 1993). Les entérotoxines ST regroupent les STa et les STb. La première est soluble au méthanol et active dans l'intestin de jeunes souris, alors que la seconde est insoluble au méthanol, inactive dans l'intestin de jeunes souris, mais active dans des segments d'intestins ligaturés de porcelets nouveaux-nés et sevrés (Dubreuil, 1997). La toxine STa engendre des flux d'eau et d'ions dans les entérocytes en activant la guanylate cyclase. La toxine STb est principalement associée avec les ETEC porcins, mais quelques souches humaines produisant Stb ont été isolées (Dubreuil, 1997).

1-2-2. Les souches entéroaggrégatives (EAggEC)

Les souches entéroaggrégatives EAggEC appartiennent au groupe le plus récemment décrit. Ces souches ressemblent aux ETEC par le fait qu'elles adhèrent aux cellules de l'intestin grêle, sont non-invasives, et n'entraînent pas des modifications histologiques majeures au niveau des cellules auxquelles elles adhèrent (Salyers & Whitt, 1994). Par contre, elles diffèrent des ETEC dans la mesure où elles n'adhèrent pas uniformément à la surface des cellules, mais forment un agrégat, d'où le terme d'adhérence aggrégative (Savarino *et al.*, 1994). Les EAggEC produisent une entérotoxine, codée par un plasmide, qui est génétiquement et immunologiquement distincte de la toxine STa des ETEC (Savarino *et al.*, 1993). Ce facteur entérotoxique surnommé East1 (pour EAggEC heat st^{able} enterotoxin 1) confère aux EAggEC leur virulence. Récemment, on a montré que le gène *east1* était trouvé chez la plupart des souches ETEC associées avec l'antigène facteur de colonisation II (CFA/II) ou CFA/IV (CS6) (Yamamoto & Echeverria, 1996). Le gène codant pour East1 serait un gène de virulence qui se retrouverait chez plusieurs souches de *E. coli* entraînant des diarrhées, et présent aussi bien chez les EAggEC que chez les EHEC (Savarino *et al.*, 1996), EPEC, et ETEC (Yamamoto *et al.*, 1997). La surface protéique des souches EAggEC joue un rôle important dans l'expression du phénotype aggrégative de ces souches (Wai, Takade & Amako, 1996). Les souches EAggEC produisent aussi une toxine similaire à l'hémolysine produite par des souches d'*E. coli* retrouvées lors des infections du tractus urinaire. Cette hémolysine forme des pores au niveau de la membrane cellulaire, et participe à la virulence de ces souches.

1-2-3. Les souches entéro-pathogènes (EPEC)

La terminologie EPEC (entéro-pathogène *E. coli*) a été proposée en 1955 pour qualifier des souches provoquant des épisodes de diarrhées infantiles humaines, d'allure épidémique dans les services hospitaliers pédiatriques et les maternités (Milon, 1993). Ces souches étaient alors caractérisées par leur appartenance à des sérogroupes O ou de sérovars O:H particuliers (Orskov & Orskov, 1992). Les souches EPEC provoquent une diarrhée aqueuse persistente du

nouveau-né chez l'homme et chez diverses espèces animales (Sussman, 1985). De plus, les mécanismes de pathogénicité ne font intervenir ni les entérotoxines thermolabiles (LT) et thermostables décrites chez les ETEC, ni le caractère d'invasivité cellulaire décrit chez les *Shigella* et les EIEC (Milon, 1993). Les EPEC sont caractérisés par leur interaction particulière avec les entérocytes, induisant une lésion dite "d'attachement-effacement" (A/E) des microvillosités de la bordure en brosse, d'où la dénomination "Attaching-Effacing *E. coli*" (AEEC) qui leur est parfois donnée, et dont un des résultats est le réarrangement de l'actine de la cellule de l'hôte (Donnenberg & Kaper, 1992). Le mécanisme par lequel ces souches produisent ces lésions d'A/E est mal compris, et il semble que cette activité dépendrait de facteurs environnementaux (Rosenshine, Ruschkowski & Finlay, 1996). Les lésions A/E typiques est connus depuis quelques années chez les animaux, notamment chez le lapin, les bovins, le porc, les caprins, les ovins, le chat et le chien (Milon, 1993). Des lésions A/E similaires à ceux observées chez les humains ont été observé chez des souches isolées de porc (Zhu *et al.*, 1994). Cependant, une confusion existe parfois entre les pathotypes EHEC et EPEC, et la plupart des souches considérées comme des EPEC et isolées chez les animaux sont en réalité des souches EHEC fortes productrices de toxines Shiga-like.

Les EPEC possèdent un système de sécrétion de type III, codé par l'îlot de pathogénicité LEE (locus of entérocyte effacement). Ce locus code pour les facteurs requis pour les lésions A/E (McDaniel & Kaper, 1997). Plusieurs gènes à l'intérieur de LEE, dont *eaeA* (*E. coli* attaching-effacing), *espB* (*eaeB*), *espA* et *espD* ont été caractérisés. Le locus *eae* code pour une OMP, l'intimine, responsable de l'adhérence intime aux cellules de l'intestin (Donnenberg *et al.*, 1993). L'étude réalisée avec des souches canines responsables de lésions A/E et possédant le gène *eaeA*, a montré que, malgré des propriétés communes avec les souches EPEC humaines, ces isolats forment un groupe à part (Beaudry *et al.*, 1996). Des études portant sur le gène *eae* chez le chien, chez qui a été isolé une souche DEPEC (pour: Dog EPEC) ont montré que les protéines produites par ce gène ont une forte similarité avec ceux des EPEC (An *et al.*, 1997). Par contre, les produits du gène *eae* chez le porc sont moins reliés génétiquement. Le produit du gène *espB* est une

protéine secrétée nécessaire pour l'adhérence et l'activation épithéliale des voies de signal transduction. Une des conséquences de la formation des microvilli est l'internalisation de quelques bactéries dans des vésicules phagocytiques. L'analyse de la séquence génétique située entre *eaeA* et *espB* a permis l'identification d'une région comprenant plusieurs cadres de lecture ouverts (ORF) dont *espA* et *espD* (Lai *et al.*, 1997). Le produit du gène *espA* est une protéine secrétée nécessaire à l'activation du signal de transduction, au contact intime de la cellule, et à la formation des lésions A/E (Kenny *et al.*, 1996). Une mutation dans *espD* annule les événements de signal de transduction qui conduit à l'activation du récepteur de l'intimine chez les cellules de l'hôte, ainsi que le phénotype A/E (Palmer *et al.*, 1997).

La plupart des souches EPEC possèdent un plasmide appelé EAF (EPEC adherence factor) qui porte le locus *bfp* (bundle forming pili), qui est responsable de l'adhérence localisée (Donnenberg & Kaper, 1992). Une adhésine nommée AIDA-I (pour Adhesin Involved in Diffuse Adherence) et responsable du phénotype d'adhérence diffuse d'une souche EPEC (souche 2787) a été identifiée. Cette adhésine est synthétisée comme précurseur et présenterait une homologie avec la protéine virG(icsA) de *Shigella flexneri* qui joue un rôle la dissémination intercellulaire des *Shigella* (Benz & Schmidt, 1993; Suhr, Benz & Schmidt, 1996).

1-2-4. Les souches entérohémorragiques (EHEC)

C'est seulement récemment que les souches EHEC ont été reconnues comme responsables de maladies graves. Ils ont été identifiés pour la première fois comme un pathotype à part entière à la suite d'une épidémie de colites hémorragiques dans le nord-ouest des États-Unis due à une souche d'*E. coli* de sérovar 0157:H7 (Milon, 1993). Par rapport à la dysenterie bacillaire classique, le syndrome en cause présentait la particularité d'une diarrhée abondante accompagnée de leucocytes fécaux, mais chez des patients afébriles. Les EHEC 0157:H7 ont été ensuite associés à un de syndromes urologiques les plus fréquents et les plus graves en pédiatrie: le syndrome hémolytique-urémique (SHU). La propriété principale des EHEC est leur faculté à produire une grande quantité d'une

cytotoxine appelée vérotoxine (VT) ou toxine Shiga-like (SLT) (Salyers & Whitt, 1994). Deux types de SLT (SLT-I et SLT-II) et des variants ont été caractérisées.

Les EHEC sont de première importance aussi bien en médecine de l'homme qu'en médecine vétérinaire. L'infection humaine est le plus souvent associée à l'ingestion de denrées alimentaires d'origine bovine (viande, lait cru). Chez les bovins, bien que l'isolement chez des animaux sains soit courant, les EHEC ont été responsables des diarrhées hémorragiques chez le veau. Les souches EHEC médient le même type d'adhérence intime observée avec les EPEC. Elles possèdent le gène *eae*, qui est similaire au gène *eae* des EPEC, et dont le produit (l'intimine) médie une adhérence étroite aux cellules épithéliales (McKee & O'Brien, 1995). On a montré récemment que cette protéine pouvait faciliter l'adhérence aux cellules Hep-2 même si elle était tronquée de 1/3 à son extrémité amino-N terminale (McKee & O'Brien, 1996).

1-2-5. Les souches entéroinvasives (EIEC)

Les EIEC ont été décrites en 1971 comme des souches entraînant des symptômes et une diarrhée sanguinolente similaires à la dysenterie causée par *Shigella* (Levine, 1987). L'affection est marquée par un syndrome fébrile, des nausées, de la diarrhée aqueuse et sanguinolente. Les souches EIEC ressemblent étroitement aux *Shigella*, et du point de vue taxonomique forment un trait d'union entre les genres *Escherichia* et *Shigella*. Il ne semble pas exister de cas d'infections naturelles chez les animaux par les EIEC (Milon, 1993).

Le mécanisme de pathogénicité des EIEC est similaire à celui des *Shigella* (Sussman, 1985). Elles adhèrent aux cellules épithéliales, se répliquent à l'intérieur de celles-ci, et disséminent latéralement aux cellules adjacentes. Ceci entraîne une nécrose et la destruction de la surface cellulaire (Hart *et al.*, 1993). Plusieurs des gènes nécessaires à la virulence sont codés sur des plasmides de virulence (Salyers & Whitt, 1994). La capacité d'invasion cellulaire est en relation avec la présence d'un plasmide de haut poids moléculaire (120-140 Mda), qui code pour une OMP assez semblable ou identique aux protéines des souches de *Shigella* (Levine, 1987).

1-3. Infections extra-intestinales

En plus des infections intestinales, les souches d'*E. coli* sont à l'origine de nombreuses maladies extra-intestinales chez l'homme et l'animal. Elles possèdent différents mécanismes pathogéniques nécessaires à une survie à l'intérieur d'un habitat aussi particulier que le tractus urinaire par exemple, ou le système vasculaire. Les infections extra-intestinales se présentent sous différentes manières. On distingue les infections du tractus urinaire, la septicémie et la méningite du nouveau-né (Donnenberg & Welch, 1996).

1-3-1. Infections du tractus urinaire

E. coli est une des principales causes de morbidité et de mortalité parmi les infections extra-intestinales acquises dans les communautés et les milieux hospitaliers, l'infection la plus commune étant l'infection du tractus urinaire (Donnenberg & Welch, 1996). On distingue plusieurs formes d'infection du tractus urinaire (ou UTI pour: Urinary Tract Infection) chez l'homme, selon le degré d'infection et les symptômes observés (Sussman, 1985; Warren, 1996). La cystite affecte la vessie, et elle est caractérisée par une dysurie; si l'infection est ascendante, les reins sont touchés, on a alors une pyélonéphrite aigüe, qui est accompagnée de douleurs avec vomissement, souvent compliquée par une bactériémie (Warren, 1996).

Un des moyens de défense de l'hôte pour les UTI est l'action de l'urine, qui permet le lavage des bactéries non-adhérentes. Les bactéries qui possèdent des adhésines sont donc plus capables de se multiplier et de provoquer une inflammation. Les pili P sont les adhésines les plus importantes dans les UTI (Salyers & Whitt, 1994). Certaines souches uropathogènes possèdent des adhésines afimbriaires (AFAI, AFAIII) de la famille Dr. D'autres facteurs de virulence, comme le LPS, les exotoxines (comme la toxine CNF et l'hémolysine), et le système d'acquisition du fer, contribuent aussi à la virulence des UTI.

1-3-2. Méningite à *E. coli*

La méningite due à *E. coli* est essentiellement une infection prédominante chez le nouveau-né (Sussman, 1985). Environ 80% de ces souches possèdent l'antigène K1 (Sussman, 1985). *E. coli* K1 est la plus importante des bactéries Gram négatives entraînant des méningites et des septicémies néo-natales. Cette bactérie est capable de traverser la barrière sanguine du cerveau. Un des mécanismes utilisés pour traverser cette barrière impliquerait probablement une transcytose à travers les cellules endothéliales. La capacité de survivre dans les cellules eucaryotes serait un des facteurs de virulence associés aux souches de *E. coli* responsables de méningite (Meier *et al.*, 1996).

Les *E. coli* portant les fimbriae S sont souvent associés dans les infections néo-natales (Siitonen *et al.*, 1993). Des études *in vitro* sur des cellules endothéliales microvasculaires du cerveau (CEMC ou BMEC pour brain microvascular endothelial cells), qui constituent la barrière sanguine du cerveau, ont été utilisées pour comprendre le mécanisme de pathogénie des méningites causées par *E. coli*. Il a été montré que les fimbriae S médient l'adhérence de *E. coli* via les adhésines SfaS et SfaA (Parkkinen *et al.*, 1988; Prasadarao *et al.*, 1993). L'adhésine SfaS est spécifique de l'épitope NeuAc- α -2,3-galactose des glycoprotéines présentes sur les cellules endothéliales. SfaA est spécifique aux glycolipides sulfatés. Mais cette adhésion n'était pas accompagnée d'une invasion, suggérant l'implication d'autres facteurs nécessaires à l'invasion des BMEC (Prasadarao, Wass & Kim, 1996a). Une protéine de 8,2 kDa produite par le gène *ibe10* a été identifiée. Le gène *ibe10* est un des gènes responsables de l'invasion des BMEC (Huang *et al.*, 1995). La protéine OmpA de la membrane externe est un des facteurs importants dans le mécanisme d'invasion des BMEC par les souches d' *E. coli* responsables de méningite. Son récepteur serait la fraction GalNAc β (1-4)GalNAc des cellules de l'endothélium vasculaire (Prasadarao *et al.*, 1996b). Les anticorps sIgA du lait maternel et du colostrum représentent l'élément essentiel dans la protection du nouveau-né, mais une fois que l'invasion est établie, l'enfant ne sera pas protégé en l'absence des IgG maternels (Sussman, 1985).

1-3-3. Septicémie à *E. coli*

C'est l'entrée des bactéries dans la circulation sanguine, avec une variété de signes cliniques. Chez l'homme, l'origine peut être une lésion discrète, comme par exemple une collection de pus, ou une infection de tissu plus importante, ou le plus souvent une infection du tractus urinaire (Sussman, 1985). Les symptômes observés sont dues à l'effet de l'endotoxine libérée par les organismes, ayant pour conséquence toute une cascade de réactions qui peut provoquer la coagulation intravasculaire disséminée et le choc endotoxique. Chez les animaux, des souches bactériémiques de *E. coli* peuvent traverser les muqueuses de l'appareil respiratoire ou du tractus digestif, et pénétrer dans la circulation sanguine. Elles entraînent une infection généralisée (colisepticémie), ou une infection localisée comme la méningite et l'arthrite chez les veaux et les agneaux, et l'air-sacculite et la péricardite chez la volaille (Morris & Sojka, 1985).

En général, pour qu'une septicémie ait lieu, il faut que les micro-organismes entrent dans la circulation en grande quantité, sur une période de temps définie. Ces souches vont soit traverser les muqueuses de l'appareil respiratoire, du tractus digestif, ou urinaire, et vont pénétrer dans le système circulatoire, où elles vont induire une infection localisée ou généralisée (Orskov & Orskov, 1985). Il faut distinguer la septicémie de la bactériémie (Sussman, 1985). Pour la bactériémie, une faible quantité de micro-organismes entre dans la circulation sur une courte période, et pourra être éliminée par le système phagocytaire sans causer de symptômes. Dans le cas de septicémie, les bactéries sont aussi éliminées de la circulation, mais on observe des symptômes causés par la libération d'endotoxines. Les bactéries peuvent se multiplier dans la circulation lorsque la fonction phagocytaire est déprimée. En réalité, on a une continuité entre la bactériémie et la septicémie, et c'est les symptômes dans le dernier cas qui fait la différence.

Les facteurs de virulence des souches de *E. coli* entraînant la septicémie sont peu connus chez l'homme. L'étude de souches de *E. coli* de sérotype O isolées à partir de patients atteints de septicémie a montré entre autres, la présence de l'hémolysine, du CNF (cytotoxin necrotizing factor), et du fimbriae F165 (Cherifi *et al.*, 1990). Une autre étude portant sur des souches septicémiques et

entérotoxigéniques de *E. coli* de sérotype O78, isolées d'humains, de bovins, ovins, porcins et de volaille, a montré une clonalité proche pour la majorité des cas (Cherifi *et al.*, 1991). Les animaux seraient probablement à l'origine de la transmission de l'infection des *E. coli* septicémique de sérotype O78. Les facteurs de l'hôte auraient un rôle déterminant dans la pathogénie, aussi bien que les facteurs de virulence bactériens (Sussman, 1985). Chez les animaux, la colibacillose systémique se retrouve fréquemment chez le veau, l'agneau, et la volaille. Elle est moins fréquente chez le porcelet. Les souches communément retrouvées chez le porc, le bovin et l'agneau appartiennent à des sérotypes différents (Gyles, 1986). Les sérotypes O78, O1 et O2 sont les plus communs chez le poulet et la dinde. Certains traits phénotypiques et génotypiques associés avec *E. coli* extra-intestinal isolée chez l'homme et l'animal sont retrouvés chez les souches aviaires septicémiques (Dozois *et al.*, 1992). On peut ainsi retrouver chez ces derniers le système d'aérobactine et la résistance au sérum, et la présence du fimbriae P. Dans une étude portant sur des souches de *E. coli* septicémique et diarrhéique isolées de porc, et qui produisent le CNF, on a observé la présence des fimbriae P portant l'adhésine de classe III. La plupart de ces souches produisent aussi les fimbriae S ou F1C (Dozois *et al.*, 1997). Le fimbriae F165 a été isolé à partir de souches de *E. coli* causant une septicémie et/ou une diarrhée chez le porcelet et le veau. La plupart de ces isolats produisent l'aérobactine, sont résistants à l'effet bactéricide du sérum, et ne produisent pas de vérotoxine (Fairbrother *et al.*, 1989; Harel *et al.*, 1993). Le fimbriae F165 donne deux sous-unités protéiques après purification, le fimbriae F165₁ et F165₂. L'expression du fimbriae F165₁ donnerait à la bactérie la capacité de résister au mécanisme de défense non spécifique de l'hôte, de se multiplier dans le sang, et de causer une septicémie (Ngeleka *et al.*, 1993).

2. Les fimbriae comme facteurs de virulence de *E. coli* extra-intestinal

2-1. Généralités

L'importance de l'adhérence bactérienne a été reconnue bien avant les premières études sur les adhésines entérobactériennes dans les années 1950. On avait observé l'importance de l'adhérence pour la survie de certaines bactéries,

comme l'attachement des bactéries aquatiques à la surface des rochers qui facilitent ainsi l'absorption des nutriments, ou celui des bactéries endogènes de la bouche au niveau de l'épithélium. On savait aussi que le virus de l'influenza et *Bordetella pertussis* entraînaient l'hémagglutination en adhérant à des récepteurs de globules rouges, récepteurs qu'on retrouvait aussi sur l'épithélium respiratoire sujet à l'infection. Ainsi, l'hémagglutination pourrait refléter la présence d'un mécanisme d'adhésion nécessaire à une infection. Par la suite, les propriétés hémagglutinantes de diverses bactéries furent étudiées de façon intensive. Ainsi différentes souches de *E. coli* furent classés selon le pattern d'agglutination à des globules rouges de plusieurs espèces différentes. Par exemple, le groupe 1, appelé aussi type 1, agglutine les globules rouges (GR) de plusieurs espèces, le groupe 2 agglutine les GR humain, ovin, bovin, le groupe 3 a seulement de faibles réactions, et le groupe 4 est non hémagglutinant (dans l'ancienne nomenclature). Les bactéries possédant les fimbriae type 1 adhèrent aussi aux leucocytes, à l'épithélium intestinal et respiratoire, et leur activité hémagglutinante est inhibé par le D-mannose (appelée alors MS pour mannose sensitive). La plupart des souches réalisent un changement spontané entre une phase fimbriaire et une phase non fimbriaire, selon la condition du milieu. Les hémagglutines résistantes à l'inhibition par le mannose sont appelés MR (mannose résistantes). Certaines souches peuvent posséder les deux adhésines MR et MS. La plupart des adhésines trouvées dans les infections intestinales et urinaires appartiennent à la classe des MR, comme par exemple K88 et K99 des souches entériques trouvés chez le porc et le bovin, et l'adhésine P des souches uropathogènes chez les humains.

Par la suite, d'autres types de fimbriae ont été caractérisés chez les entérobactéries. Les fimbriae de type 2 chez certains souches de *Salmonella*, le type 3 chez *Klebsiella pneumoniae* et autres, le type 4 chez *Proteus* et *Providentia*, le type 6 chez certaines souches de *Klebsiella ozaenae* (Duguid & Old, 1994).

Depuis la découverte des fimbriae, ces appendices filamenteux ont eu divers appellations, comme "filaments", "fimbriae", "pili", "cilia" (Ottow, 1975). L'appellation "fimbriae" a été introduite par Duguid et son école en 1955 (fimbriae en latin : fibre, ou filament). Celui-ci réfutait l'appellation "pili" proposée par

Brinton (pili: en latin signifie cheveu). On utilisera le terme “fimbriae” pour désigner tout appendice bactérien non flagellaire, autres que ceux impliqués dans le transfert de matériel génétique pendant la conjugaison, qui sont appelés “pili” ou “sex pili” (Ottow, 1975).

Le fimbriae est constitué de plusieurs copies de sous-unités structurales qui confèrent au fimbriae une spécificité antigénique, et dans certains cas, une faible copie de sous-unités mineures (Smyth *et al.*, 1994). L’une des sous-unités, l’adhésine, a des propriétés spécifiques de liaison, les autres étant essentielles à la présentation de l’adhésine au niveau de l’extrémité de la surface fimbriaire. Les fimbriae ont une longueur variant de 0,2 à 20 μm . La largeur varie de 30 à 140 Å, et certains sont encore plus épais et plus longs (Ottow, 1975).

L’adhésion d’*E. coli* aux tissus de l’hôte est une des premières étapes dans les infections extra-intestinales. L’attachement est médié soit par des fimbriae, soit par des adhésines difficiles à distinguer au microscope électronique et souvent nommé adhésines non-fimbriaires ou afimbriaires (Duguid & Old, 1980). L’adhésine fimbriaire est de nature protéique, et le récepteur localisé sur les cellules eucaryotes est généralement de nature glucidique. Cette étape est importante lors du processus infectieux.

2-2. Classification

L’hémagglutination et l’adhésion aux cellules eucaryotes ont été un outil important pour la caractérisation des fimbriae. Une classification similaire à celle des antigènes O:K:H basée sur le sérotypage a été développée, quoiqu’on utilise encore l’ancienne nomenclature employée en diagnostic et dans la littérature (Klemm, 1985). Mais la nomenclature des fimbriae reste encore confuse. L’utilisation de l’hémagglutination en absence ou en présence de D-mannose, ou de ses analogues, donne une distinction entre les adhésines mannose résistant (MR), et les adhésines mannose-sensible (MS) qui sont inhibées par le mannose (Parry & Rooke, 1985). Mais cette méthode est limitée, et la caractérisation de la structure des récepteurs des adhésines MR est plutôt utilisée pour les P fimbriae (Parry & Rooke, 1985). L’utilisation des propriétés adhésives pour la classification des

fimbriae est limité par certains facteurs. Dans certains cas, la protéine fimbriaire qui joue le rôle de l'adhésine est la sous-unité mineure, distincte de la sous-unité majeure du fimbriae, comme par exemple pour les fimbriae de type 1 ou S (Low, Braaten & Van Der Woude, 1996). Dans d'autres cas, la sous-unité majeure peut avoir une propriété adhésive, comme par exemple pour le fimbriae K88. Par conséquent, l'identification des propriétés adhésives des fimbriae ne donne pas nécessairement une indication sur la nature des sous-unités fimbriaires.

L'utilisation du PCR (polymerase chain reaction) a permis une identification des adhésines de manière plus précise et plus sensible. Les trois variants alléliques de *papG* des fimbriae P de *E. coli* uropathogènes, et codant pour les adhésines se liant au groupement Gal(α 1-4)Gal, ont pu être identifiés par cette méthode (Johnson & Brown, 1996). D'autres adhésines, associées à des souches de *E. coli* septicémique et diarréique, ont aussi été caractérisés (Bertin *et al.*, 1996).

Chez certaines souches ETEC isolés de porcelets et de veaux, les fimbriae avaient été considérés comme des antigènes K (K88, K99), qui diffèrent des antigènes capsulaires par leur nature chimique. Chez les humains, certains fimbriae portent le sigle CFA (Colonization Factor Antigen), dont le CFA/II qui est un complexe de trois fimbriae CS1, CS2, et CS3 (Coli Surface antigen) (Evans *et al.*, 1979). Certains fimbriae sont désignés selon la pathologie induite comme par exemple pour les fimbriae P ou Pap (Pyelonephritis associated pili), ou selon la souche de provenance de *E. coli* e.g fimbriae 987P (Klemm, 1985). D'autres sont caractérisés par le récepteur auquel ils adhèrent, par exemple comme les fimbriae P qui adhèrent aux globules rouges humains du groupe sanguin P (Klemm, 1985). Une nouvelle classification dans laquelle les fimbriae sont désignés par la lettre F est aujourd'hui de plus en plus utilisée (Orskov & Orskov, 1990) (Tableau 1).

Fimbriae	Type	Adhésine	Sous-unité majeure	Récepteur
Type 1	F1A	FimH (PilE)	FimA (PilA)	α -D-Mannose
P (Pap)	F7-F16	PapG	PapA	Gal(α 1-4) β Gal
Prs	F13	PrsG		GalNAc(α 1,3)- β GalNAc
F165 ₁	F165 ₁			GalNAc-GalNAc
S		SfaS	SfaA	Acide sialique
F165 ₂	F165 ₂			
AFA-I		AfaE1	-	Antigène Dr
AFA-III		AfaE3	-	Antigène Dr
CS31A			ClpG	

Tableau 1. Fimbriae d'*E. coli* extra-intestinal

2-3. Biogénèse

La biogénèse des fimbriae est un processus complexe faisant intervenir plusieurs étapes (Hacker, 1990). L'opéron fimbriaire *pap* est le mieux étudié (Figure 1). Les séquences génétiques ont été déterminées, et on a identifié 11 gènes de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' codant pour des protéines qui ont été très bien étudiées.

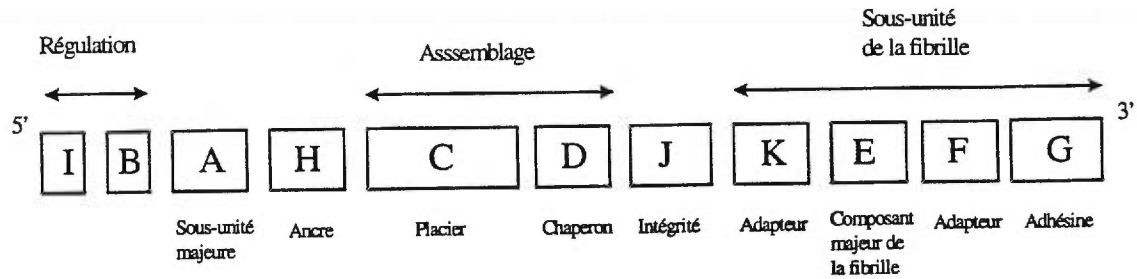


Figure 1. Organisation génétique de l'opéron *pap*

Brièvement, on distingue six protéines structurales qui forment le pili P, deux protéines accessoires qui servent à l'assemblage, deux protéines de régulation, et une protéine qui jouerait le rôle de cochaperone (Hultgren, Jones & Normark, 1996). On a deux assemblages distincts: le pili à l'extrémité distale, relié à une fine fibrille à l'extrémité de laquelle se trouve l'adhésine. Ces gènes codent pour des protéines ayant des fonctions multiples (Hacker, 1990). En résumé, on a:

- une protéine impliquée dans le transport des sous-unités à travers l'espace périplasmique (chaperon), codé par *papD*,
- une protéine localisée au niveau de la membrane externe (usher ou placier), sert de canal et lieu d'assemblage; elle est codée par *papC*,
- une protéine dont le poids moléculaire varie de 16,8 à 22 kDa, représente la sous-unité majeure du fimbriae et est codée par *papA*,
- des sous-unités mineures, codées par les gènes *papJ* (maintient l'intégrité du fimbriae), *papK* (contrôle la longueur de la fibrille), *papE* (adaptateur dans l'assemblage de la protéine majeure Pap-A), *papF* (rôle dans la présentation de l'adhésine, et la force de liaison adhésine-récepteur), *papG* (code pour l'adhésine spécifique au récepteur Gal-Gal), *papH* (détermine la longueur des fimbriae et permet leur ancrage sur la membrane externe),
- et enfin des protéines de régulation codées par *papI* et *papB*.

Les opérons *fim*, *pap*, *sfa*, et *afa* d'*E. coli* extra-intestinal présentent une analogie structurale caractérisée par quatre régions distinctes, allant de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3': une région possédant les gènes de régulation, une région

codant pour la sous-unité majeure, une région centrale indispensable à la biogénèse des fimbriae et de leur adhésine, une région 3' possédant les gènes qui codent pour un polypeptide impliqué dans la reconnaissance de l'adhésine, et les gènes codant pour les sous-unités mineures impliquées dans l'assemblage de l'adhésine au fimbriae (Smyth *et al.*, 1994). Le degré d'homologie des séquences nucléotidiques de ces opérons est faible, bien qu'il existe de fortes analogies sur le plan fonctionnel (Schmoll, 1987; Smyth *et al.*, 1994).

Les sous-unités mineures qui peuvent avoir un rôle dans l'adhésion ont été décrites chez les *E. coli* associées à des infections extra-intestinales (SfaS, PapG, FimH). La formation de complexes chaperons-sous-unités permet la protection des sous-unités contre la dégradation protéolytique par les protéases périplasmiques et d'éviter un assemblage prématuré à l'intérieur de la cellule bactérienne (Hultgren *et al.*, 1996). Le placier, qui est une protéine de la membrane externe de haut poids moléculaire (80-95 kDa), intervient dans l'assemblage des sous-unités pour la formation du fimbriae de manière ordonnée (Smyth *et al.*, 1994). D'autres adhésines sont moins bien connues, comme DraA qui est associée aux UTI et diarrhées, dont le récepteur est l'antigène Dr du groupe sanguin, ainsi que Bma et Afa associées aux pyélonéphrites (Hultgren *et al.*, 1996).

2-4. Génétique

Les opérons exprimant les adhésines de *E. coli* extra-intestinal sont localisés sur le chromosome. L'organisation des opérons *pap* et *sfa* a été bien étudiée. Par contre, les fonctions de tous les produits des gènes exprimés par *dra*, *bma*, et *afa*, n'ont pas été clairement élucidées (Hacker, 1990). On peut dire que, d'après l'arrangement des différents opérons, les produits des gènes de poids moléculaires similaires ont une fonction similaire chez leurs opérons respectives. En particulier, la protéine de haut poids moléculaire chez chacun des opérons assure le rôle de placier (Smyth *et al.*, 1994). Les opérons *dra*, *bma*, *afa*, et *nfa* expriment seulement 5 protéines, à la différence de l'opéron *pap* qui en exprime 11 (de Graaf & Gastra, 1994; Smyth *et al.*, 1994).

2-5. Régulation

La capacité de *E. coli* de synthétiser des fimbriae confère à la bactérie un avantage considérable en terme de colonisation. Par contre, la production de fimbriae impose un grand stress à la bactérie quand on considère que les sous-unités fimbriaires représentent 5 à 10% des protéines totales de la cellule (Smyth *et al.*, 1994). La capacité de réagir et de répondre aux conditions environnementales qui influencent l'expression des fimbriae est donc essentielle. L'expression des fimbriae est dépendante de nombreux systèmes de régulation, comme la thermorégulation, l'osmorégulation, la disponibilité en fer, et la répression catabolite (Smyth & Smith, 1992). Chez les *E. coli* pathogènes, on observe la répression de la synthèse fimbriaire à des températures faibles. En général, l'expression des fimbriae est optimum *in vitro* à 37°C dans un milieu de croissance limité en fer et en glucose. Ces conditions sont semblables à celles que les bactéries rencontrent dans l'intestin. Cette capacité d'émettre ces signaux pour que l'expression des fimbriae se réalise est très importante pour la pathogénie et la survie des bactéries.

L'exemple type qui montre l'importance de la régulation locale et globale est celui de la biogénèse des fimbriae P (Smyth & Smith, 1992). Ces fimbriae sont contrôlées par la variation de phase dans laquelle leur synthèse alterne avec une phase ON (production de fimbriae) et une phase OFF (pas de fimbriae). Le gène de régulation *papI* est à OFF lorsque la température est à ou moins de 26°C. En plus de cette régulation, d'autres protéines comme la CRP, catabolite repressor protein, la Lrp, leucine-responsive regulatory protein, et la H-NS histone-like protein interviennent dans la régulation. La protéine H-NS agit dans l'expression des fimbriae en réprimant l'expression, et le CRP comme un anti-répresseur (Smyth & Smith, 1992).

3- Les fimbriae d'*E. coli* extra-intestinal

3-1. Fimbriae type 1

Les fimbriae de type 1 sont caractérisés par leur abilité d'agglutiner les globules rouges de cobaye en l'absence de D-mannose. Appelé parfois fimbriae de

type commun, ils sont retrouvés chez plusieurs espèces d'*Enterobacteriaceae* et plus de 80% des souches sauvages de *E. coli* en possèdent (Klemm & Krogfelt, 1994). Comme les autres fimbriae de *E. coli*, les fimbriae de type 1 sont codés par un groupe de gènes qui codent pour les sous-unités de structure, l'adhésine, plusieurs protéines accessoires (comprenant la protéine de transport, d'assemblage, de liaison) et des protéines de régulation (Johnson, 1991). Des études faites en particulier à partir d'isolats de *E. coli* J96 (provenant d'infection du tractus urinaire) et de *E. coli* K12 (Klemm & Krogfelt, 1994) ont donné une représentation détaillée des gènes *fim* et de leur organisation. Les gènes *fimB* et *fimE* (ou *hyp*) sont impliqués dans la régulation. Adjacent à ces derniers se trouve le gène *fimA* (ou *pilA*) encodant la protéine majeure structurale. Le gène *fim* code pour une protéine homologue à la protéine FimA, ainsi que pour une composante structurale du fimbriae. Les gènes *fimC* (ou *pilB*) et *fimD* (ou *pilC*), situés au centre du groupement de gènes, sont impliqués dans la biogénèse du fimbriae. Le gène *fimC* code pour une protéine à localisation membranaire et *fimD* joue un rôle dans le transport trans-membranaire des sous-unités. La partie distale de l'opéron code pour 3 gènes, *fimF* (*pilD*), *fimG* (*pilF*), et *fimH* (*pilE*) dont les produits, qui sont des protéines mineures, sont impliqués dans la biogénèse du fimbriae (Klemm & Krogfelt, 1994).

L'analyse de mutants a montré que la partie distale du gène *fim* était essentielle pour l'adhésion des fimbriae de type 1 (Klemm & Krogfelt, 1994). En effet, les sous-unités mineures ne sont pas nécessaires à l'intégrité structurale du fimbriae, mais les bactéries qui en sont dépourvues ne sont plus adhérentes et non hémagglutinantes. FimH est la molécule adhésive du fimbriae, et se trouve intégrée à l'intérieur de la structure fimbriaire (Krogfelt, 1990). FimF et FimG semblent être requis pour l'intégration de l'adhésine FimH à l'extrémité, mais aussi à des intervalles différents le long du fimbriae.

Les fimbriae de type 1 sont soumis à la variation de phase, avec un changement réversible entre une phase fimbriaire (ON) et une phase non fimbriaire (OFF). Ces phases peuvent être sélectionnées par des conditions environnementales (Johnson, 1991).

Les récepteurs pour les fimbriae de type 1 se trouvent sur les globules rouges de nombreuses espèces, ainsi que sur les vaisseaux sanguins et la musculature (Klemm & Krogfelt, 1994). Les fimbriae de type 1 adhèrent aux cellules buccales, intestinales et vaginales humaines *in vitro*. Des récepteurs ont aussi été identifiés sur les macrophages (Blumenstock & Jann, 1982), donc le rôle possible de ces fimbriae dans la phagocytose.

Les fimbriae de type 1 semblent avoir un rôle dans la colonisation et la phagocytose. Ils sont capable de promouvoir un cycle fécal/oral de bactéries entériques, avec l'intervention de ces fimbriae dans l'étape primaire de la colonisation oro-pharyngée.

3-2. Fimbriae P

Les fimbriae P (P pour pyélonéphrite, et pour antigène P du groupe sanguin humain) sont associés à des souches d'*E. coli* retrouvées dans les infections sévères du tractus urinaire et les bactériémies. Les fimbriae P ont une structure et une organisation similaires mais des adhésines différentes. Ils forment une famille de fimbriae antigéniquement variable, représentant les différents sérotypes F (Orskov & Orskov, 1990)

3-2-1. Structure et génétique

Le groupe de gènes codant pour les fimbriae P possède des gènes pour la sous-unité structurale, l'adhésine, et plusieurs protéines accessoires impliquées dans le transport et l'assemblage, ainsi que des protéines de régulation, comme décrit précédemment au chapitre 3-3. Onze gènes localisés sur un opéron sont impliqués. L'opéron *pap* (pour pyélonéphritis associated pili) est celui qui est le mieux étudié (Kuehn *et al.*, 1994). On utilise parfois le terme (*fso*, *fst*) pour des variants fimbriaires (Johnson, 1991). Les promoteurs sont modulés par les deux produits des gènes *papB* et *papI*. La sous-unité majeure PapA, constituant le corps de fimbriae, est nécessaire à la formation du fimbriae. PapD est le chaperon et PapC le placier. Le rôle exact de PapJ n'est pas clair. L'adhésine PapG se trouve à l'extrémité de la fibrille et se lie au récepteur α -D-galactopyranosyl-(1-4)- β -D-

galactopyranoside (Gal α (1-4)Gal) des cellules. Les fimbriae P ne sont pas exprimés de façon constitutive. La croissance est favorisée à 37°C et sur milieu solide, est inhibé à 18-22°C sur milieu liquide (Johnson, 1991). Ils subissent aussi la variation de phase où les bactéries vont exprimer une phase ON (expression du fimbriae) et une phase OFF (afimbriaire) (Hacker, 1990).

3-2-2. Récepteurs et adhésion

En cherchant les récepteurs uro-épithéliales pour lesquelles des bactéries urinaires adhèrent en présence de mannose, on a découvert que la plupart des souches adhérentes agglutinaient les érythrocytes humain du groupe sanguin P. Les fimbriae isolés de ces souches agglutinaient les érythrocytes humains avec la même spécificité d'adhésion que les bactéries d'origine (Johnson, 1991). Les antigènes du groupe sanguin P sont une famille d'oligosaccharides contenant la partie Gal(α 1-4)Gal β (portion (Gal-Gal)), qui sont aussi présents dans certaines cellules de mammifères, et qui constituent la composante carbohydate des glycosphingolipides. Les glycolipides contenant la portion Gal-Gal sont les récepteurs déterminants pour l'adhésion des souches de *E. coli*. On a démontré que la protéine PapG est l'adhésine de Gal(α 1-4)Gal β , qui déterminait la spécificité de liaison (Lund *et al.*, 1987). Il y a trois variants de l'adhésine de PapG catégorisés selon l'adhérence aux glycolipides: l'adhésine de classe I (G-I /PapG), qui se lie plus spécifiquement au globotriaosylceramide GbO₃, l'adhésine de classe II (G-II) qui reconnaît le globotétrasyleramide GbO₄, et l'adhésine de classe III (G-III) appelée aussi adhésine F ou Prs, qui se lie au globopentasyleramide GbO₅ contenant le disaccharide GalNAc-GalNAc ou l'antigène de Forssman (Lund, 1988; Kuehn *et al.*, 1994) . La propriété d'adhérence des souches de *E. coli* est variable selon que les récepteurs glycolipides sont présentes sur une phase solide (par exemple TLC/Thin Layer Chromatography ou ELISA/Enzyme Linked Immunoabsorbant Assay) ou présentes à la surface des cellules. En général, l'adhérence au niveau des glycolipides de la surface cellulaire est plus restreinte, probablement due en partie aux contraintes stériques sur la conformation des carbohydrates.

3-2-3. Tropisme tissulaire et pathogénie

Chez les humains, les globosérides GbO₃ et GbO₄ (adhésines G de classe I et II) se trouvent en abondance sur les globules rouges, au niveau des reins et de l'uretère, d'où l'importance des souches de *E. coli* dans les infections du tractus urinaire (UTI) (Donnenberg & Welch, 1996). Chez le chien, les récepteurs GbO₅ sont exprimés en grande quantité au niveau du rein (exemple des cellules MDCK-II d'origine canine), d'où l'importance des souches exprimant les pili de classe III (Prs) dans les UTI du chien (Hultgren *et al.*, 1996). Il est intéressant de noter que l'adhésine de classe III est communément retrouvée chez les humains qui souffrent de cystite. En effet, les individus infectés par des *E. coli* type Prs possèdent souvent des globo-A sur leur cellules uro-épithéliales, qui, comme les globopentosyl ceramides, jouent le rôle de récepteurs pour les adhésines de classe III (et non pour les classes II). Différentes adhésines G peuvent donc déterminer aussi bien un tropisme tissulaire qu'un tropisme de l'hôte (Kuehn *et al.*, 1994). On a montré aussi que les fimbriae P se lient à des récepteurs de la matrice extra-cellulaire comme la fibronectine, et cette liaison serait due par les sous-unités protéiques E et F du fimbriae (Westerlund, 1993).

Les fimbriae P sont important dans la pathogénèse des UTI, et représentent un facteur de virulence majeur des souches de *E. coli* uropathogènes. Ils ont été les seuls à avoir été intimement associés avec les UTI supérieurs et les uro-septicémies. L'adhésine PapG, spécifique au récepteur Gal $\alpha(1-4)$ Gal des cellules, est essentiel dans les cas de pyélonéphrites (Roberts *et al.*, 1994). Environ 90% d'enfants avec une première pyélonéphrite aigu portent des *E. coli* possédant les fimbriae P. Ces derniers sont aussi prédominant chez les femmes présentant une pyélonéphrite aigüe (Svanborg, Orskov & Orskov, 1994).

3-3. Fimbriae S et F1C

Les fimbriae S et F1C sont reliés étroitement, et se trouvent fréquemment chez les souches isolés de cas de méningite du nouveau-né, de septicémies, et parfois parmi les souches uropathogènes (Johnson, 1991). Ils sont retrouvés chez

des souches de *E. coli* isolées de porcs diarrhéiques ou septicémique (Dozois *et al.*, 1997). Chez les humains, les fimbriae S sont plutôt associés aux méningites et aux septicémies qu'aux UTI.

Les fimbriae S (S pour: Sialic-acid specific fimbriae) se lient aux récepteurs contenant les portions acide sialique, d'où leur nom. Ils agglutinent les érythrocytes humain et bovin. Par contre, les fimbriae F1C n'ont pas de propriété hémmagglutinante, et sont parfois appelé "pseudotype I fimbriae" à cause de l'homologie de la séquence amino-acide N-terminale de la protéine majeure de structure avec la séquence protéique du N-terminus du fimbriae type I (Hacker & Morschhäuser, 1994). On a trouvé un haut niveau de relation entre les gènes codant pour les fimbriaes S (*sfa*:S fimbrial adhesin) et F1C (*foc*). Des récepteurs pour les fimbriae S sont trouvés sur les cellules épithéliales des tubules proximales et distales, des tubes collecteurs, des glomérules, de l'endothélium vasculaire du rein (Johnson, 1991), et au niveau du cerveau (Prasadarao *et al.*, 1993). Les fimbriae F1C sont le plus souvent associés à des souches uropathogènes. Ils adhèrent aux tubules distales et aux tubes collecteurs des reins, ainsi qu'à l'endothélium vasculaire des reins et de la vessie (Hacker & Morschhäuser, 1994). Un autre gène *sfr* (S/F1C related), codant pour une protéine homologue à ceux codés par *sfa* et *foc*, a été identifié (Pawelzik *et al.*, 1988).

3-3-1. Structure et génétique

Les fimbriae S et F1C partagent une structure génétique commune, avec des gènes pour la sous-unité majeure, l'adhésine, et plusieurs protéines accessoires localisés sur le chromosome (Johnson, 1991). Deux opérons codant pour le fimbriae S, *sfaI* et *sfaII*, ont été clonés à partir de la souche 536 uropathogène et d'une souche IHE3034 isolée de méningite, respectivement (Hacker & Morschhäuser, 1994). L'opéron *sfa* qui comprend 9 gènes, est constitué: des gènes *sfaG*, *sfaS* et *sfaH*, qui codent pour les sous-unités mineures du fimbriae; de *sfaA* qui code pour la sous-unité majeure; des gènes *sfaB* et *sfaC* qui sont nécessaires à la régulation de l'expression, et des gènes *sfaD*, *sfaE*, *sfaF* qui jouent un rôle dans le transport et l'assemblage des sous-unités. SfaE a une homologie similaire aux

chaperons d'autres adhésines fimbriaires, et SfaF semble être une protéine de la membrane externe (Hacker, 1990). Le fimbriae F1C est composé de la sous-unité majeure FocA et des sous-unités mineures FocF, FocG, et FocH. Ces protéines sont homologues aux protéines Sfa.

3-3-2. Récepteurs et adhésion

Les fimbriae S adhèrent aux récepteurs contenant le groupement acide sialique, par l'intermédiaire de la protéine SfaS. Une région de l'adhésine composée de 6 acides aminés serait impliquée dans l'interaction avec le récepteur spécifique du fimbriae (Morschhauser *et al.*, 1993). Tandis que les sous-unités majeures SfaA des complexes SfaI et II sont hétérologues, les séquences en acide aminé de SfaS sont identiques. Des mutations dans *sfaS* n'enlèvent pas la propriété d'adhérence du fimbriae, ce qui laisse supposer un autre site d'attachement, qui impliquerait SfaA et SfaG (Marre, Kreft & Hacker, 1990). Cette adhésine joue aussi un rôle additionnel dans la biogénèse du fimbriae.

Les fimbriae S adhèrent à différents types cellulaires, comme les érythrocytes humains et bovins, les cultures de cellules endothéliales humaines, les cellules de reins LLC-PK1, les coupes de tissus rénales, l'endothélium vasculaire du rein (Korhonen *et al.*, 1990; Morschhauser *et al.*, 1993). Elles sont exprimées par des souches causant la méningite du nouveau-né, et l'UTI, et adhèrent aux glycoprotéines possédant une extrémité α -sialyl-acid-2-3- β -galactosamine (Hacker, 1990). Elles permettent l'adhérence de *E. coli* aux cellules endothéliales microvasculaires du cerveau, par l'intermédiaire des adhésines SfaS et SfaA (Prasadarao, Wass & Kim, 1997). Elles adhèrent aussi aux glycoprotéines de Tamm-Horsfall présentes dans l'urine, à la matrice extracellulaire comme la laminine (Virkola *et al.*, 1993), aux tissus du cerveau (Parkkinen *et al.*, 1988; Prasadarao *et al.*, 1993) et aux globules gras de lait humain (Hacker & Morschhäuser, 1994). A la différence des fimbriae S, les fimbriae F1C n'ont pas de propriété hémagglutinante, et aucun récepteur n'a été identifié. Ces fimbriae adhèrent aux tubules distales et aux tubes collecteurs du rein, à l'endothélium vasculaire des reins et de la vessie, et aux cellules LLC-PK1 (Marre *et al.*, 1990).

3-3-3. Tropisme tissulaire et pathogénie

On a vu précédemment que les fimbriae S se lient à différents types cellulaires. Dans les cas de méningite à *E. coli* du nouveau-né, ils représentent le facteur de virulence le plus important isolé, après l'antigène capsulaire K1. La sous-unité SfaG est impliquée dans l'activation du plasminogène, qui donne la plasmine. Celle-ci entraîne le processus fibrinolytique des tissus, qui est une étape importante dans la pathogénie des méningites du nouveau-né (Hacker & Morschhäuser, 1994). Les fimbriae S permettent l'adhérence aux tubules proximaux et distaux, aux tubes collecteurs, à l'endothélium des vaisseaux sanguins du rein, à la vessie (Korhonen *et al.*, 1990), mais leur incidence dans les UTI est plus faible que pour les fimbriae P. Ceci est probablement la conséquence de la liaison aux protéines de Tamm-Horsfall, qui sont les protéines les plus abondantes de l'urine, et qui entraîneraient l'élimination des souches S fimbriées.

Les fimbriae F1C induisent l'adhérence aux tubes collecteurs et aux tubules distaux du rein chez l'homme. Environ 30% des souches d'*E. coli* provoquant des UTI exprimeraient les fimbriae F1C (Hacker & Morschhäuser, 1994).

3-4. Fimbriae F165

Les fimbriae F165 ont été identifiées par Fairbrother *et al.*, sur des souches de *E. coli* O115 causant des septicémies chez des porcelets (Fairbrother *et al.*, 1986). On les retrouve chez des souches d'*E. coli* isolées de porcelets et de veaux atteints de septicémies et/ou de diarrhées, et le plus souvent chez les souches de sérogroupes O8, O9, O101, et O141 (Fairbrother, Larivière & Johnson, 1988b) (Contrepois *et al.*, 1989). La plupart des isolats sont non-entérotoxigéniques, produisent l'aérobactine, sont résistants à l'effet bactéricide du sérum, et ne produisent pas de vérotoxine (Fairbrother *et al.*, 1989). Ces fimbriae sont longs et rigides, avec un diamètre d'environ 5 à 8 nm, et leur expression dépend de la composition du milieu de culture (Fairbrother *et al.*, 1988a). Les fimbriae F165 est en fait un complexe fimbriaire, qui après purification donne deux sous-unités protéiques distinctes, désignées sous le nom de fimbriae F165₁ et F165₂, et qui sont

sérologiquement et génétiquement distincts Fairbrother *et al.*, 1988a; Harel *et al.*, 1992a; Harel *et al.*, 1995).

3-4-1. Fimbriae F165₁

Le clonage du fragment génomique de l'ADN, requis pour l'expression du fimbriae F165₁, a été réalisé à partir d'une souche porcine septicémique de *E. coli* O115 4787 (Harel *et al.*, 1992b). La sous-unité majeure F165₁A a un poids moléculaire de 18.5 kDa (Fairbrother *et al.*, 1988a; Harel *et al.*, 1992b) . Le séquençage amino-terminal de F165₁ et les acides aminés dérivés de la séquence nucléotidique de la sous-unité majeure montre une homologie avec les fimbriae F11, membre de la famille P. Ce fimbriae appartient génétiquement à la classe des fimbriae P, mais possède une adhésine ayant une structure différente et une spécificité de récepteur différente des adhésines associées au fimbriae P, c'est-à-dire Gal α (1-4) (Maiti *et al.*, 1994; Harel *et al.*, 1992a) . C'est une adhésine de classe III similaire à l'adhésine Prs du fimbriae F13, avec une légère différence dans les propriétés adhésives. F165₁ reconnaît la portion GalNAc α (1-3)GalNAc de l'antigène de Forssman et agglutine les érythrocytes ovins et humains du groupe A₁P₁ (Harel *et al.*, 1992a; Fairbrother *et al.*, 1993). A la différence des fimbriae Prs, elle agglutine aussi les érythrocytes porcins (Maiti *et al.*, 1994).

Pour évaluer le rôle du fimbriae F165₁ dans les infections, des mutants négatives pour ce fimbriae ont été construits. On a démontré que la présence de l'ensemble du système fimbriaire était indispensable pour entraîner une pathogénicité complète chez des porcelets gnotobiotiques (Ngeleka *et al.*, 1993). Il semble que F165₁ jouerait un rôle dans l'adhérence extra-intestinale, permettant ainsi la colonisation et la survie des bactéries dans les tissus de l'hôte. L'expression de F165₁ confère à la bactérie la capacité de résister au mécanisme de défense non-spécifique de l'hôte, de se multiplier dans le sang, et de causer une septicémie (Ngeleka *et al.*, 1993). On a montré *in vitro* que le mutant négatif pour le fimbriae ainsi que la souche sauvage sont résistants à l'effet bactéricide du sérum, et produisent tous les deux l'aérobactine. La survie extra-intestinale des souches F165₁-positives s'expliquerait donc par un autre mécanisme autre que la présence

du fimbriae. (Ngeleka *et al.*, 1993) (Harel *et al.*, 1992a). Par contre, ces mêmes fimbriae favorisent l'adhérence et l'ingestion des bactéries aux leucocytes polymorphonucléaires du porc, mais empêchent la réponse oxydative (Ngeleka, Martineau-Doize & Fairbrother, 1994).

On a montré que la régulation *in vitro* de F165₁ est similaire à ceux des fimbriae d'*E. coli* impliqués dans les infections extra-intestinales chez les humains. La région de régulation de F165₁ montre une organisation similaire à celui des fimbriae P, avec deux gènes *I* et *B*, transcrits en direction opposé. Cette région contient aussi toutes les propriétés impliquées dans la variation de phase et la répression catabolite (Daigle *et al.*, 1997). L'expression de F165₁ est maximale sur milieu minimum solide (MD-1), à une température de 37°C et en aérobiose. L'expression diminue quand les cellules sont à 18°C. Comme pour les autres fimbriae d'*E. coli* pathogènes, F165₁ est probablement adapté pour être exprimé à la température normale du corps de l'hôte.

3-4-2. Fimbriae F165₂

Le fimbriae F165₂ a une sous-unité majeure de poids moléculaire 17.2 kDa. Il a été purifié à partir de la souche pathogène d'*E. coli* 4787 (Dubreuil & Fairbrother, 1992). Comme pour les fimbriae F1C, F165₂ n'a aucune propriété hémagglutinante. Les déterminants génétiques codant pour F165₂ ont été clonés à partir d'une souche septicémique porcine d'*E. coli* O115 (Harel *et al.*, 1995). L'opéron *f165₂* est homologue à l'opéron *foc* et appartient à la famille des fimbriae S. La protéine majeure F165₂A et les sous-unités mineures F, G, H ont une forte homologie avec les sous-unités majeures et mineures de F1C (Harel *et al.*, 1995). Pour les premiers 33 résidus d'acides aminés, la séquence de F165₂A est identique à F1B, et très similaire au fimbriae F1C associé aux souches d'*E. coli* uropathogènes humaines (Dubreuil & Fairbrother, 1992). Le rôle du fimbriae F165₂ dans la pathogénie n'a pas encore élucidé.

4- Autres facteurs de virulence de *E. coli* extra-intestinal

4-1. Le lipopolysaccharide (LPS)

Le LPS ou endotoxine est un composant structural situé à la surface externe des bactéries Gram négatives. Il est localisé exclusivement sur le côté externe de la bactérie, d'où son rôle important dans l'interaction avec le milieu environnant ou les cellules de l'hôte (Rietschel, Labischinski & Naumann, 1990). Le LPS contribue à la résistance des micro-organismes contre l'effet bactéricide du sérum, et joue un rôle important dans la résistance aux cellules phagocytaires. Il est constitué de trois régions distinctes: le lipide A, le core oligosaccharidique, et l'antigène O spécifique (Rietschel *et al.*, 1990). Le lipide A est intégré dans la membrane externe, et est responsable de plusieurs effets pathologiques dont le choc endotoxique et la fièvre. Des réponses immunitaires diverses sont induites par le lipide A, dont l'activation des macrophages et du complément, et l'induction de cytokines (Jacobs, 1985; Johnson, 1985). Le lipide A est hautement conservé, et il est le constituant obligatoire du LPS.

L'antigène O est constitué d'unités répétitives d'oligosaccharides de structure de composition variable. C'est la fraction responsable de la spécificité sérologique (Orskov & Orskov, 1992). La chaîne O polysaccharidique est à l'origine de divers effets biologiques, comme la résistance au sérum, la résistance à la phagocytose des monocytes, et la résistance aux peptides cationiques (Joiner, 1988; Taylor, 1983). Elle agit comme une barrière qui empêche l'insertion du complexe d'attaque membranaire MAC dans la paroi bactérienne. La chaîne O est aussi importante dans l'attachement des bactériophages et l'interaction avec la membrane des cellules eucaryotes. Les activités biologiques de la chaîne O semblent être associées avec leur taille et leur distribution à la surface externe de la bactérie. Les chaînes longues sont plus importantes dans la médiation des effets biologiques des bactéries que les chaînes courtes.

La "LPS-Binding Protéine" (LBP) du plasma joue un rôle crucial dans la reconnaissance de la LPS, avec qui elle se lie avec une grande affinité. Le complexe LPS-LBP interagit avec les récepteurs CD14, avec pour conséquence l'activation des macrophages et de la synthèse des cytokines (Wan *et al.*, 1995). La stimulation

excessive des cellules immunitaires de l'hôte (monocytes et macrophages) par le LPS, impliquant les cytokines TNF- α et IL-1 en particulier, peut entraîner un choc septique.

Les gènes responsables de la biosynthèse du LPS sont retrouvés sur le chromosome bactérien. Les gènes *rfa* et *rfb* codent pour le core oligosaccharidique et pour les unités de la chaîne O. Les gènes *lpx* et *kdt* codent pour le lipide A et le noyau interne. Le gène *rol* régule la longueur de la chaîne polysaccharidique de l'antigène O sur le core oligosaccharidique (Schnaitman & Klena, 1993).

4-2. Hémolysine

L'hémolysine de *E. coli* (Hly) est une exotoxine bien caractérisée appartenant à la famille des cytotoxines RTX, appelée ainsi car toutes les protéines de cette famille contiennent une duplication de 9 acides aminés (RTX: repeats in toxin). Ces toxines sont associées à une grande variété de pathogènes Gram-négatifs chez l'homme et l'animal (Welch *et al.*, 1981). Hly est un facteur de virulence associés aux infections urinaires et autres infections extra-intestinales d'*E. coli*. Chez l'homme, environ 50% des souches de *E. coli* causant des infections extra-intestinales produisent l'hémolysine et sont hémolytiques (Cavalieri, Bohach & Snyder, 1984; Welch *et al.*, 1981). Sa toxicité envers les érythrocytes et autres cellules est relié à la formation des pores transmembranaires des bicouches lipidiques. La toxine lyse les cellules et libère le fer nécessaire à la croissance bactérienne.

La synthèse et la sécrétion de l'hémolysine est déterminée par l'opéron *hly*, qui comprend quatre gènes contigus: *hlyCABD* (Welch *et al.*, 1981). Ces gènes sont localisés sur le chromosome des souches d'*E. coli* humaines ou sur les plasmides des souches d'origine animales. La pro-hémolysine Pro-HlyA est activée en HlyA par acylation, activation qui requiers HlyC. La toxine activée HlyA est ensuite sécrétée à travers la voie *sec*-indépendant, grâce aux produits HlyB et HlyD, ainsi que la protéine de la membrane externe TolC. On a montré que plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse du LPS affectaient l'expression ou l'activité de l'hémolysine. En effet, des mutations sur les gènes *rfaH* et *rfaP* diminuent l'activité

hémolytique de Hly. Un effecteur de l'opéron *rfa*, RfaH, affecte positivement l'expression de HlyA, tandis que la mutation de *rfaC* affecte l'accumulation de l'hémolysine sans affecter sa sécrétion (Bailey *et al.*, 1992; Bauer & Welch, 1997). On a montré récemment que l' α -hémolysine induit la libération de IL-1 et non de TNF, *in vitro* sur des monocytes humains. L'effet de l'hémolysine sur la réponse de cytokines est non seulement différent des LPS, mais pourrait induire une mortalité indépendamment de TNF (May *et al.*, 1996).

4-3. Facteur nécrosant cytotoxique

Le facteur nécrosant cytotoxique (appelé CNF pour Cytotoxin Necrotising Factor) est une catégorie de toxines découverte récemment chez *E. coli*, et qui induit chez les cellules eucaryotes en culture une réorganisation drastique des microfilaments. En culture cellulaire, on observe la multinucléation et l'élongation des cellules (Caprioli *et al.*, 1983; Caprioli *et al.*, 1987). Cette activité biologique est associée à la capacité du CNF d'induire une modification post-translationnelle de la protéine rho liant la GTP, qui est impliquée dans la régulation de la synthèse des microfilaments (Oswald *et al.*, 1994). Deux types de CNF ont été caractérisés, en fonction de leur origine clinique, de leur toxicité *in vivo*, et de leur déterminant génétique (De Rycke *et al.*, 1990). Le premier, CNF1, est rencontré chez les souches de *E. coli* d'origine humaine et animale. Il est isolé de cas de septicémies, de diarrhées, d'UTI, et il est modérément nécrotique. Le gène responsable se trouve sur le chromosome. Le deuxième type de cytotoxine, CNF2, est produit par quelques souches de *E. coli* isolées de septicémies et de diarrhées chez les ruminants. Il est codé par les plasmides F-like (plasmides Vir) et est fortement dermonécrotique. Les deux toxines sont assez similaires en poids moléculaire (110-115 kDa) ainsi qu'immunologiquement. Mais ils se distinguent par le sérotype des souches de *E. coli* qui produisent ces toxines. La plupart des souches produisant le CNF synthétisent aussi l'hémolysine, malgré que les deux activités soient dissociées. Le rôle exact de ces toxines en tant que facteurs de virulence n'est pas très claire. On sait qu'elles possèdent une propriété toxique (nécrotoxicité sur la peau de lapin, léthalité chez les animaux après administration par voie parentérale). De plus,

CNF1 a la capacité d'induire l'entrée de bactéries non-invasives dans les cultures cellulaires (Falzano *et al.*, 1993). Il est intéressant de noter l'association des *E. coli* produisant le CNF avec les infections systémiques chez l'homme et l'animal.

4-4. Antigène capsulaire

En plus du LPS, les antigènes de surface *E. coli* sont formés d'une capsule polysaccharidique, ou antigène K (Jann & Jann, 1992). En général, les souches extra-intestinales de *E. coli* sont capsulées. Ce sont des facteurs de virulence importants qui permettent aux bactéries pathogènes d'échapper ou de s'opposer aux défenses non spécifiques de l'hôte durant les premières phases de l'infection.

Il existe plus de 70 différentes capsules chez *E. coli*, classés en 2 groupes selon des critères chimiques, physiques et génétiques (Jann & Jann, 1990). On a défini deux groupes d'antigènes capsulaires I et II. Le groupe I thermostable peut être divisé en polysaccharides contenant des sucres aminés (groupe IB), et n'en contenant pas (groupe IA). Le groupe II thermolabile est aussi divisé en groupes selon la nature des composants acides. Les déterminants génétiques codant pour l'expression des capsules sont localisés sur le chromosome bactérien. Ceux du groupe I sont près de *his* et ceux du II sont près de *serA*. La biosynthèse et l'expression de surface ont été étudiées de façon extensive avec des polysaccharides du groupe II.

La capsule nuit à l'action du complément et des cellules phagocytaires. La bactérie échappe alors à l'activité bactéricide du complément (Cross, 1990). L'immunogénicité des capsules bactériens est souvent reliée avec l'âge de l'hôte. Ainsi, plusieurs souches bactériennes sont non-immunogéniques chez les nouveau-nés et les jeunes, d'où l'inefficacité de vaccins polysaccharidiques chez les enfants. Mais on peut rencontrer aussi une faible immunogénicité de la capsule chez les adultes, et ceci est dû à la similarité des polysaccharides capsulaires avec les carbohydrates de l'hôte. Ce camouflage utilisé par les bactéries est une des stratégies utilisées pour contrer le mécanisme de défense de l'hôte.

4-5. Aéro bactéine

Une des réponses de l'hôte à l'infection est de réduire la quantité de fer disponible aux bactéries pathogènes. La carence en fer est alors une des barrières que les bactéries doivent surmonter pour proliférer à l'intérieur de l'hôte. Un système de chélation du fer consiste à produire des sidérophores, qui sont des molécules de faible poids moléculaire, et capables de fixer le fer avec une grande affinité, pour le délivrer ensuite à la bactérie (Bullen, 1981). L'aéro bactéine est le sidérophore le plus efficace chez les *E. coli*. L'incidence de l'aéro bactéine est très élevée chez les souches de *E. coli* causant des infections extra-intestinales chez l'homme et l'animal. Les souches possédant le système d'aéro bactéine ont un avantage de croissance dans un milieu pauvre en fer, comme le sérum et l'urine (De Lorenzo & Martinez, 1988). La synthèse de l'aéro bactéine est codée par des gènes situés soit sur des plasmides (ColV), soit sur des chromosomes. L'opéron de l'aéro bactéine du plasmide pCol-K30 de la souche de *E. coli* K12 consiste en 5 gènes pour la biosynthèse et le transport du sidérophore (Crosa, 1989; Neilands, 1992). Le système chromosomique de l'aéro bactéine est souvent associé avec d'autres déterminants de virulence comme le P ou F1C fimbriae, la capsule K1, ou la résistance au sérum (Bollmann *et al.*, 1997; Blum, Marre & Hacker, 1995).

4-6. Colicine V

La colicine V (ColV) est une toxine d'environ 9 kDa codée par plusieurs variétés de gros plasmides. Ces plasmides ont été retrouvés chez des souches invasives de *E. coli* isolés chez l'homme et l'animal, et sont souvent associés avec des facteurs de virulence tels que le système aéro bactéine de séquestration du fer, l'augmentation de survie dans le sérum, et la résistance à la phagocytose (Waters & Crosa, 1991). La production de la toxine anti-bactérienne ColV est une propriété commune aux souches qui sont à l'origine de bactériémie chez l'homme et l'animal (Smith, 1974).

L'acquisition du plasmide ColV par une souche était toujours accompagnée par une augmentation de la létalité chez les animaux de laboratoires, et par une diminution lorsque les plasmides ColV étaient curées de la souche (Quackenbush &

Falkow, 1979). Ceci n'est pas associé à l'activité toxique de ColV, mais à une plus grande capacité de la bactérie de survivre dans le sang et les fluides péritonéaux. L'inactivation des gènes responsables de la synthèse de ColV ne diminue pas la virulence des souches ColV positives, montrant que la virulence ne dépend pas de la production de ColV (Quackenbush & Falkow, 1979). Les plasmides ColV peuvent donc déterminer des phénotypes qui peuvent jouer un rôle dans la virulence des souches pathogènes. Chez les bactéries invasives en particulier, on observe la présence du système de captation du fer et la résistance au sérum liés à la présence de ces plasmides. Ceci est un avantage pour les bactéries qui sont en compétition avec les cellules de l'hôte pour le fer, et qui peuvent résister à l'effet bactéricide du sérum. La présence du plasmide ColV chez les souches *E. coli* K1 augmente la virulence de ces souches dans les modèles animaux de cas de méningite du nouveau-né et d'infections urinaires (Aguero *et al.*, 1989).

C'est le locus *iss* (increased survival serum) qui est responsable de la résistance au sérum (Binns, Mayden & Levine, 1982). D'autres gènes ont aussi été identifiés, comme les gènes responsables de la synthèse et de l'exportation de ColV. Le gène *cvi* code pour une protéine de la membrane qui confère une immunité aux cellules qui produisent la ColV, *cvaC* code pour la toxine ColV. ColV utilise un système d'exportation faisant intervenir au moins 3 gènes: le gène chromosomique *tolC* et deux gènes plasmidiques *cvaA* et *cvaB*. Les protéines codées par *cvaA* sont essentielles pour une optimisation de la sécrétion de ColV (Zhang *et al.*, 1995). La sécrétion de ColV est indépendante du système de sécrétion Sec de *E. coli* mais requiert un signal d'exportation N-terminal spécifique au système d'export CvaAB/TolC (Zhang *et al.*, 1995).

4-7. Protéines de la membrane externe

Certaines souches de *E. coli* expriment sur leur membrane externe certaines protéines majeures appelées OMP pour Outer Membrane Protein. Ce sont des antigènes de surface qui peuvent augmenter la virulence des souches pathogènes. Les OMP les plus étudiés sont produites par les gènes *iss* et *traT*, situés sur les plasmides ColV et F respectivement. La présence du gène *iss* confère une résistance

au sérum, probablement par l'inhibition de l'activité du MAC sur la membrane externe (Taylor, 1983). La lipoprotéine TraT, codée par le gène *traT* souvent associé aux plasmides conjugatifs F, augmente la résistance des bactéries à l'action lytique du complément, qui est la forme de résistance majeure chez les bactéries invasives. Il semble que le rôle de TraT serait l'inhibition de l'insertion du MAC, et la réduction de la capacité des souches sauvages de *E. coli* à être phagocytés par les macrophages (Pramoonjago *et al.*, 1992). Une autre propriété de TraT est l'exclusion de surface, correspondant à la capacité réduite d'une souche possédant un plasmide conjugatif d'agir comme receveur dans la conjugaison, avec des cellules possédant des plasmides identiques ou proches (Sukupolvi & O'Connor, 1990). TraT est souvent associé avec les souches extra-intestinales qu'aux souches fécales.

5. Îlots de pathogénicité

5-1. Définition

Dans les années 80, le groupe de Goebel analysa des souches de *E. coli* uropathogènes qui étaient capables de produire des facteurs de virulence spécifiques, comme l'alpha-hémolysine. Les gènes *hly* étaient localisés sur de larges régions du DNA chromosomiques qui furent appelés "îlots de l'hémolysine" (Hacker *et al.*, 1997). D'autres études révélèrent par la suite que d'autres gènes additionnels, impliqués dans l'uropathogénicité, étaient localisés sur ces îlots (en particulier les déterminants codant pour les P fimbriae). On leur donna alors le nom d'"îlots de pathogénicité". Par la suite, le terme d'îlot de pathogénicité (PAIS pour "pathogenicity island") fut utilisé pour définir de larges fragments de DNA situés sur le chromosome, et qui code pour des gènes de virulence, chez des bactéries pathogènes (Blum *et al.*, 1994; Morschhauser *et al.*, 1994)

On a identifié des PAIS chez des souches de *E. coli* uropathogènes, chez des souches EPEC, et d'autres espèces bactériennes (Falkow, 1996). Pour éviter une confusion d'utilisation, Hacker *et al.* ont proposé une définition plus précise de ce terme (Hacker *et al.*, 1997). Ainsi, un PAIS peut être défini selon les critères suivant:

- Présence de gènes de virulence, souvent plusieurs.
- Présence chez les souches pathogènes, et absence (ou distribution sporadique) chez les souches moins pathogènes dans une espèce (ou espèce reliée).
- Contenu G+C différent en comparaison à l'ADN bactérien de l'hôte.
- Occupation de grandes régions chromosomiques (souvent supérieur à 30 kb).
- Représente des unités génétiques compactes et distinctes, souvent flanquées d'unités répétitives aux extrémités.
- Association avec des gènes ARNt et/ou des éléments de séquence d'insertion (IS) aux extrémités.
- Présence de gènes de "mobilité" (éléments IS, transposases...).
- Instabilité.

Certains auteurs trouvent que le fait de limiter la définition à une localisation chromosomique est arbitraire et inadéquat (Mecsas & Strauss, 1996). En effet, des phages et de nombreux plasmides peuvent facilement s'insérer dans, et s'exciser du chromosome. De plus, plusieurs éléments transposables se répliquent et fonctionnent aussi bien dans le chromosome que sur un élément extrachromosomal. Plutôt que d'employer la localisation chromosomique comme critère de définition, il serait plus pertinent, selon ces auteurs, d'utiliser le terme de "blocs de gènes apparemment étranger trouvés uniquement chez des souches pathogènes et nécessaires à la virulence"(Mecsas & Strauss, 1996)

Les PAIS sont trouvés aussi bien chez les bactéries Gram négatives que chez les Gram positives. Par contre, chez ces derniers, ils ne possèdent pas de sites de jonction spécifiques aux extrémités, ne possèdent pas de gènes de mobilité, et sont intégrés de manière stable dans le génome (Hacker *et al.*, 1997).

5-2. Caractéristiques

Les PAIS contiennent des gènes de virulence et des éléments de régulation. La présence de gènes codant pour des protéines secrétées, ou des protéines de surface (hémolysine, fimbriae...) est assez commune. Plusieurs PAIS contiennent des gènes codant pour des systèmes de sécrétion et des "sensors" environnementaux

(protéines sensorielles). Par exemple, ils possèdent des gènes de virulence codant pour le système de sécrétion de type III, et peuvent aussi coder pour des protéines qui régulent l'expression de gènes situés à l'extérieur de l'îlot de pathogénéité (Mecssas & Strauss, 1996).

Une seule souche bactérienne peut contenir plusieurs PAIS, et un seul PAIS peut être composé de différents segments qui peuvent agir indépendamment l'un de l'autre (Mecssas & Strauss, 1996). Les PAIS peuvent conférer des phénotypes de virulence complexes, et sont probablement acquis par les bactéries à partir d'organismes non reliés, d'où les diverses hypothèses sur l'évolution des bactéries qui en ont découlé (Lee, 1996). Les PAIS des *E. coli* pathogènes représenteraient des fragments d'anciens plasmides ou de chromosomes spécifiques aux phages, qui auraient été insérés dans le chromosome bactérien. Mais le mécanisme par lequel les PAIS se sont intégrés dans l'ADN chromosomique, et l'identité des vecteurs qui transportent les PAIS d'un micro-organisme à l'autre sont peu connus.

La propriété des PAIS d'être stable, et selon le cas instable, peut conférer un certain avantage à la bactérie. Par exemple, l'expression de certains gènes de virulence peut être inappropriée à un stade particulier de l'infection, et la perte de gènes peut être indispensable à la bactérie. A l'opposé, l'existence de facteurs de virulence particulier peut être un avantage pour la bactérie, résultant en un PAIS stable dans le génome. L'excision d'un PAIS du chromosome peut affecter l'expression de gènes en altérant le site d'insertion du chromosome. Par exemple, l'excision de PAI-I de *E. coli* uropathogène, qui s'insère au niveau du gène tRNA de la sélénocystéine (*selC*), entraîne la délétion d'une partie de ce gène, qui a pour conséquence l'inhibition de la croissance anaérobie de la bactérie, due à son incapacité de produire la déshydrogénase qui contient la sélénocystéine (Mecssas & Strauss, 1996).

6- Adhérence et invasion

6-1. Adhérence

Les bactéries pathogènes attaquent habituellement l'hôte susceptible à la surface des muqueuses respiratoire, gastrointestinale, ou du tractus génital et urinaire

(Beachey, 1988). Pour coloniser ces surfaces, les micro-organismes vont résister aux nombreuses barrières non spécifiques qui comprennent les mécanismes de nettoyage comme la toux, l'éternuement, le péristaltisme, et aussi vont échapper au système de défense immunitaire de l'hôte (Beachey, 1988). L'adhérence spécifique à différentes cellules de l'hôte est souvent importante, non seulement pendant le contact initial entre le pathogène et l'hôte, mais aussi tout au long du cycle d'infection. Plusieurs micro-organismes adhèrent à la surface des cellules épithéliales des muqueuses, se multiplient et demeurent fixés à la surface de l'hôte pendant le reste de l'infection (Falkow, Isberg & Portnoy, 1992). Les pili bactériens, communément associés à cette forme d'adhérence, interagissent avec des molécules polysaccharidiques spécifiques de l'hôte. De même, la bactérie peut posséder des récepteurs qui vont se lier à des protéines ou polysaccharides produits par l'hôte, qui vont ensuite adhérer à des récepteurs de l'hôte, ce qui permet indirectement un lien entre la bactérie et les cellules de l'hôte (Falkow *et al.*, 1992).

L'interaction pathogène-hôte se passe le plus souvent au niveau de l'épithélium de la muqueuse (respiratoire, gastro-intestinale, ou du tractus urinaire) qui est le contact initial avec le pathogène. Après l'adhésion, certaines bactéries restent localisées à la surface, d'autres envahissent les tissus adjacents et disséminent dans l'organisme. Les barrières formées par les cellules épithéliales ou endothéliales peuvent être traversées soit à travers les cellules (voie transcellulaire), soit entre les cellules, après disjonction des jonctions intercellulaires ou destruction cellulaire (voie péricellulaire) (Mim's *et al.*, 1995). La notion de tropisme tissulaire fait référence aux micro-organismes qui envahissent certains tissus en particulier (Beachey, 1988). Ce tropisme peut être dû à la présence de récepteurs qui sont régulés lors de leur développement, ou présent seulement dans certaines cellules. Le tropisme implique aussi une différence structurale entre les glycoprotéines liées ou sécrétées, ou des différences de conformation entre les récepteurs membranaires (Strömberg *et al.*, 1992). Par exemple, *E. coli* est communément retrouvée dans les infections du tractus urinaire, mais rarement dans l'appareil respiratoire supérieur. La spécificité d'adhérence peut aussi limiter une infection à une espèce animale. Par exemple, le fimbriae Pap de *E. coli* se lie aux résidus Gal-Gal de l'antigène P

du groupe sanguin; par conséquent, les individus au phénotype p- ne possédant pas la structure Gal-Gal ne lient pas les fimbriae Pap (Beachey, 1988).

E. coli exprime une grande variété de facteurs d'adhérence fimbriaires et non fimbriaires, qui permettent à la bactérie d'augmenter sa capacité à capter les nutriments nécessaires à sa survie, et par conséquent se multiplier et coloniser les muqueuses épithéliales de manière efficace (Finlay & Siebers, 1995). Pour les *E. coli* pathogènes, l'adhérence est la première étape d'une série complexe d'évènements qui entraînent la maladie (Oelschlaeger, 1996). Après adhérence, les bactéries peuvent envahir les cellules de l'hôte et atteindre la circulation générale. Certains pathogènes ont développé des mécanismes qui leur permettent d'entrer dans les cellules qui ne sont pas naturellement phagocytaires. Cette invasion cellulaire se fait après un changement du cytosquelette de la cellule. Les facteurs d'adhésion responsable de l'entrée dans les phagocytes et les cellules épithéliales ne sont généralement pas associés aux fimbriae. Les adhésines codées par les opérons sont contrôlées par des facteurs environnementaux et une phase de variation qui génère un phénotype d'adhérence selon l'environnement (Strömberg *et al.*, 1992). L'hémagglutination est un des plus simples test *in vitro* utilisé pour caractériser les propriétés d'adhérence de *E. coli* (Strömberg *et al.*, 1992). Les érythrocytes de différentes espèces animales sont mélangées avec des cultures bactériennes, ou des préparations d'adhésines. L'observation d'une agglutination démontre une réaction positive. Certains utilisent des réactions d'adhérence sur coupe de tissus congelés (Korhonen *et al.*, 1986) ou des cultures cellulaires (Duguid & Old, 1980; Echeverria *et al.*, 1992) Pour démontrer la stéréospécificité de l'interaction adhésine-récepteur dans l'adhérence bactérienne, plusieurs tests peuvent être réalisés (Beachey, 1988). On peut démontrer indirectement l'adhérence par inhibition spécifique de l'adhérence de l'organisme aux cellules (par exemple utilisation d'anticorps dirigé contre l'adhésine ou le récepteur) ou par blocage de l'adhérence des bactéries aux cellules de manière compétitive par l'adhésine ou le récepteur isolé.

6-2. Invasion

Plusieurs bactéries pathogènes ont la capacité d'envahir les cellules eucaryotes non phagocytaire par endocytose et disséminer dans les tissus de l'hôte. La plupart échappent aux mécanismes de défense du système immunitaire de l'hôte en produisant des capsules polysaccharidiques antiphagocytaires, qui vont générer des variations antigéniques au niveau de leur surface, ou alors deviennent des parasites intracellulaires (Gorby *et al.*, 1988). La résistance à l'effet bactéricide du sérum leur permet d'échapper aux défenses de l'hôte au niveau du site initial de l'infection et de disséminer dans l'organisme. Un grand nombre de lignées cellulaires a été utilisé comme modèle *in vitro* pour étudier l'interaction des souches entériques invasives, comme *Salmonella*, *Shigella*, et plusieurs espèces d'*E. coli* entéropathogéniques (Galan & Sansonetti, 1996). Ceux-ci adhèrent et pénètrent à l'intérieur des cellules. Des phénotypes caractéristiques, comme le réarrangement de la membrane chez *Salmonella* et *Shigella*, et les lésions de type attachant et effaçant (AE) pour la plupart des souches EPEC ont été observé (Falkow, 1996). Certains organismes sécrètent des enzymes au niveau de la surface mucoale de l'hôte, qui forme une barrière, pour faciliter l'internalisation de la bactérie (Finlay & Siebers, 1995). Un grand nombre d'études ont montré que nombreux pathogènes entériques invasives utilisent les cellules M des plaques de Peyer localisées dans l'intestin, et qui sont caractérisées par de petits microvilli, une endocytose active, et peu de lysosomes (Jones, Pascopella & Falkow, 1995).

Les stratégies d'invasion diffèrent selon le pathogène étudié. *Salmonella* et *Shigella* sont parmi les espèces les mieux étudiées. Après une première étape d'adhésion, *Shigella* est internalisée par un processus dépendant des microfilaments d'actine ("phagocytose induite"), accompagné d'un réarrangement du cytosquelette. *Shigella* échappe ensuite de la vacuole phagocytique, se multiplie et se dissémine à l'intérieur du cytoplasme cellulaire, puis passe aux cellules adjacentes par des protusions de la surface cellulaire et la mort des cellules épithéliales (Goldberg & Sansonetti, 1993). Les gènes *IpaA*, *IpaB*, *IpaC*, et *IpaD* (*ipa* pour invasion plasmid antigen) ont été identifié pour leur rôle dans le mécanisme d'invasion (Goldberg & Sansonetti, 1993). D'autres gènes ont par la suite été caractérisés.

A la différence de *Shigella*, *Salmonella* reste internalisée dans une vacuole, et peut se répliquer dans les cellules non phagocytaires. La caractérisation d'une souche de *S. typhimurium* déficiente à l'invasion a permis l'identification d'un locus *inv* nécessaire à l'internalisation de la bactérie dans les cellules non phagocytaires. L'analyse de cette région a permis d'identifier au moins 14 gènes (*invA,B,C,E,F,G,H,I,J* et *spaO,P,Q,R,S*) (Galan & Sansonetti, 1996) (Betts, 1992). Une mutation dans ces gènes (à l'exception de *invH*) n'a pas d'effet sur l'adhérence des cellules, indiquant que l'entrée et l'adhérence sont deux événements génétiquement indépendants chez *Salmonella* (Galan & Sansonetti, 1996).

Jusqu'à récemment, les souches de *E. coli* intestinal et extra-intestinal ont été considérées comme des pathogènes extra-cellulaires seulement. En plus des souches de *E. coli* EIEC connus pour être entéroinvasives facultatives, plusieurs travaux de laboratoire ont révélé que des souches ETEC (Elsinghorst & Kopecko, 1992), EPEC (Scaletsky, Pedrosa & Fagundes-Neto, 1996), et EHEC (Oelschlaeger, Barrett & Kopecko, 1994) étaient capables d'envahir des phagocytes non professionnels humains. Chez les EIEC, on a montré que leur système d'invasion était identique à *Shigella* spp. Chez les ETEC, un système simple comportant seulement un gène a été cloné, avec 2 systèmes d'invasion séparés situés sur le chromosome (Elsinghorst & Kopecko, 1992).

La propriété d'invasion *in vitro* a été démontrée chez des souches de *E. coli* extra-intestinal, comme les UTI et les méningites. Ainsi, des souches de *E. coli* provenant de cas de pyélonéphrite (Donnenberg *et al.*, 1994) et d'infections urinaires (Straube *et al.*, 1993) peuvent être internalisées à l'intérieur de cellules rénales humaines et porcines (LLC-PK1) respectivement. Comme on l'a vu en détail dans le chapitre 1-3-2. précédent, *E. coli* K1, qui est la bactérie Gram négative la plus importante dans les cas de méningite, est internalisée dans les cellules endothéliales micro-vasculaires du cerveau (BMEC) (Huang *et al.*, 1995). Peu d'informations existent sur les facteurs génétiques impliqués dans l'invasion des souches de *E. coli* extra-intestinal. Chez les souches de *E. coli* K1 responsables de méningite, on a démontré que l'adhésion et l'invasion étaient deux mécanismes distincts (Prasadarao *et al.*, 1996b). Deux loci ont été identifiés comme étant responsables de

l'invasion des cellules BMEC. Un des gènes, *ibe10*, a été identifié et caractérisé (Huang *et al.*, 1995). Une protéine de la membrane externe, OmpA, a aussi été identifiée comme étant un des facteurs importants dans le mécanisme d'invasion (Prasadarao *et al.*, 1996b).

III- MATÉRIELS, MÉTHODES ET RÉSULTATS

**Studies on epithelial cell adhesion and invasion by
septicemic *Escherichia coli* O115:F165**

Beka L., and J. Harel*

Mailing address:

Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc,
Département de Pathologie et Microbiologie
Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire,
C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada, J2S 7C6

*corresponding author

phone: (514) 773-8521 ext 8233

Fax: (514) 778-8108

e-mail: harelj@ERE.UMONTREAL.CA

Running title: adherence and invasion of F165 positive *E. coli*.

Soumis à: Current Microbiology

Keys words: adherence, invasion, septicemic *E. coli*, fimbriae

Abstract

Extra-intestinal *Escherichia coli* is a frequent cause of urinary tract infection, neonatal meningitis, and septicemia. Certain virulence determinant, such as expression of adhesins which are usually associated with fimbriae, contribute to the pathogenicity of those strains. *E. coli* O115: F165 strains are associated with septicemia in young pigs and possess at least two fimbriae, F165₁ that belongs to the P family with a class III G-adhesin and F165₂ which belongs to the S family. Adherence and invasiveness of *E. coli* 5131 and 4787 F165₁- and F165₂-positive strains, and also derivative or mutants in genes involved in or associated with F165₁ were examined in cell culture. Strains expressing F165₁ and F165₂ fimbrial determinants were adherent to MDCK-II and LLC-PK1 cells but not to HeLa cells. The F165₁ defective mutant M48 was less adherent to MDCK-II cells than its parental strain. It was shown previously that F165₁ fimbriae may have a role in extraintestinal adherence allowing the colonisation and survival of the bacteria in host tissues. Adherence of the strain expressing the cloned determinant F165₁ was greater than for the strain which expressed F165₂ fimbriae. No invasion phenotype was observed for any of the strains compared to the positive control invasive strains. Fimbriae F165₁ and F165₂ may have a role in the pathogenicity of *E. coli* O115: F165, but how these strains penetrate the intestinal epithelium and entry to the bloodstream needs to be investigated

INTRODUCTION

Extraintestinal *Escherichia coli* strains is a frequent cause of urinary tract infection, neonatal meningitis and septicemia in humans and animals (27) (30). Certain virulence determinants, such as expression of adhesins which are usually associated with fimbriae, contribute to the pathogenicity of these strains (23). Fimbriae mediate specific attachment to receptors present on host cells and thus permit bacterial colonization of the host, an important step in pathogenesis.

The role of fimbriae in the pathogenesis of septicemia is not well understood. Investigators have shown that fimbriae CS31A, associated with septicemic isolates in calves, was required for adherence but not for invasion of epithelial cells, in an *in vitro* system (19). In bacterial meningitis, S-fimbriae and outer membrane protein A have been shown to promote binding and invasion respectively of *E. coli* to brain microvascular endothelial cells (29).

Fimbriae F165 is produced by *Escherichia coli* O115 isolates causing septicemia in young pigs (7). F165-positive strains of *E. coli* O115 express at least two serologically and genetically distinct fimbriae, F165₁ and F165₂ (10, 15, 16). F165₁ has a major fimbrial subunit which is related to that of F11 fimbriae of the P fimbriae family, and bears a class III G-adhesin similar to Prs with slightly different binding capacity (15, 22). In contrast to Prs, the F165₁ G fimbrial adhesin also agglutinates porcine erythrocytes. F165₂ fimbriae is closely related to F1C fimbriae, a member of the S fimbriae family (5, 16).

In a previous studies, it was suggested that F165 could contribute to the pathogenicity of these isolates (7, 8). F165₁-negative strains were less pathogenic in experimentally infected pigs (25). To date, it is not known whether F165₂ fimbriae contribute to the development of porcine colisepticemia.

The operons coding for F165₁ and F165₂ fimbriae, (*foo*) and (*for*) respectively, have been cloned from a pathogenic strain 4787, and express a major fimbrial subunit of 18.5 kDa (15, 16), and 17.5 kDa respectively (16). F165₁ adhesin defective mutants were generated in the wild-type pathogenic *E. coli*

O115:K"V165":F165 strain 5131 (14). Two classes of isogenic *TnphoA* fimbrial mutants were obtained: class I were F165₁-negative, MRHA-negative, and class II mutants were F165₁-positive, MRHA-negative.

In contrast to enterotoxin mediated diarrhea, the pathogenesis of septicemic colibacillosis is not well understood. Although fimbrial adhesins of enterotoxigenic *E. coli* have an established role in adhesion, the role of fimbriae in the pathogenesis of invasive disease has not been determined. Several investigators have made use of cultured mammalian cells as a model to study bacterial adherence and invasion. In the present studies, cell culture has been used to examine the adherence and invasiveness of *E. coli* serogroup O115:K"V165":F165 strain 5131 and 4787. The bacterial adherence and the internalization of *E. coli* strains were measured by using LLC-PK1 cell line, a permanent line of porcine tubuloepithelial cells, MDCK-II cell line, a continuous line of canine renal epithelial cells, and HeLa cell line. LLC-PK1 cells possess receptors for S fimbrial adhesins and F1C fimbriae (23). MDCK-II cells contains large amount of GbO5 or Forssman antigen. It was shown that pili of P family with class III adhesins mediate agglutination of RBCs (red blood cells) that contains high level of GbO5, and mediate adhesion to MDCK-II cells (17). *E. coli* serogroup O115:K"V165":F165 strains 5131 and 4787 (F165₁ and F165₂-positive) induce septicemia in experimentally infected pigs. In order to evaluate the role of F165₁ and F165₂ fimbrial determinants in adherence and invasion, mutants obtained using *TnphoA* transposon insertion mutagenesis in genes involved in or associated with F165 were used, as well as recombinant strains expressing F165₁ or F165₂ fimbriae. In this study, we present adherence and invasion data for the *E. coli* (O115:K"V165") isolates, and explore the possible involvement of F165₁ and F165₂ in adherence.

Materials and methods

Bacterial strains and culture conditions

Bacterial strains used in this study are listed in Table 1. Wild-type strains of *E. coli* 4787 and 5131 (O115:K"V165") isolated from the intestinal content of diarrheic piglets, have been described previously (8). These strains express F165₁ (Prs like) and F165₁ (F1C like) fimbrial adhesins. Mutant 2 (*pstC::TnphoA*) and mutant M48 (*fooA::TnphoA*) were obtained by *TnphoA* mutagenesis into chromosomal DNA of *E. coli* strain 5131, as described previously (Harel et al., 1992). The mutant 2 mediates mannose-resistant hemagglutination (MRHA +), is serum sensitive and avirulent in piglet (14) (24). Mutant M48 (*fooA::TnphoA*) does not express F165₁A and its MRHA phenotype has become negative (25). *E. coli* HB101(pCJ7) and HB101(pYvan), express the cloned F165₁ and F165₂ fimbrial determinants respectively. The operons *foo* and *tot* coding for F165₁ and F165₂ were cloned from wild type strain 4787 (15, 16). Septicemic *E. coli* 424 strain (O40:K+:H27), provided by Steve L. Moseley, University of Washington, Seattle, Washington, and expressing the CS31A fimbrial adhesin (20) (2) was used as a positive control for adherence and invasion assays (19). *E. coli* HB101 was used as a negative control strain. *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028) was used as a positive control in the invasion assay. Bacteria were grown at 37⁰C with agitation at 200 rpm, in Luria-Bertani (LB) broth, or minimal Davis plus casamino acids (MD-1) broth. When necessary, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin 50 µg/ml and chloramphenicol 34 µg/ml.

Tissue culture cells

Different cell lines were used: LLC-PK1 (ATCC CL-101) a permanent line of porcine tubuloepithelial cells provided by F. Daigle, INRA Toulouse, France, was maintained in Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM), supplemented with 1% of glutamine, and 10% of fetal bovine serum (FBS). Strain II Madin-Darby canine kidney (MDCK-II), a continuous line of canine renal epithelial cells (ATCC CCL-34) provided by D. Haslam, Washington University, and HeLa cells (ATCC CCL-2) were maintained in MEM supplemented with 10% of FBS. All cell lines were supplemented with 100 IU of penicillin per ml, and 100 µg of

streptomycin per ml. All reagents for tissue culture were obtained from Gibco BRL Laboratories, Ontario.

Adherence assay

In vitro adherence to epithelial cells was assayed as described by Korth (20), with some modifications. Briefly, cells were grown routinely in 75-cm² flasks at 37⁰C in 5% CO₂, humidified atmosphere. Confluent stock cultures were trypsinized, and new stock cultures were seeded with 10⁵ cells/ml. For all experimental assays, 24-well tissue culture trays (Falcon, Becton Dickinson Labware, Lincoln Park, New Jersey) with cover slip were seeded with either MDCK-II, LLC-PK1, or HeLa cells suspended in the corresponding medium, with antibiotics. Cells were grown at 37⁰C to a nearly confluent monolayer and washed twice in Hanks buffered salt solution. Medium without antibiotic was then added to each chamber. Approximately 10⁵, 10⁶, 10⁷, and 10⁸ organisms as determined by measuring culture turbidity at 600 nm were added to each well. The number of viable organisms added was confirmed by performing plate counts from serial dilutions of the inocula. Infected monolayers were incubated in different plates for various period: 0.5 h ; 1 h; 2 h; and 3 h at 37⁰C under 5% CO₂ atmosphere to allow the bacteria to adhere to the cells. Following the incubation, the medium was removed and monolayers were washed vigorously three times with phosphate-buffered saline (PBS), fixed and stained with Diff-Quick stain (Baxter Scientific Product, McGaw Park, IL).

After staining, cells were examined under a light microscope. Data represents the means of three different experiments. Results were standardized and are given as the number of bacteria adherent for 100 eucaryotic cells (19).

Invasion assay

The invasion assay was performed essentially as described by Korth et al. (19) with some modifications. Cells were seeded into 24-well microtiter plates (approximately 10⁵ cells per well). Bacteria grown overnight in L broth medium, pelleted, and resuspended in tissue culture medium, was added. Bacterial

suspension containing 10^5 , 10^6 , 10^7 , and 10^8 CFU were added to cell to monolayer which did not contain any antibiotic, and the plates were centrifugated at 800 Xg for 10 min. The actual inoculum for each experiment was determined by quantitative plate counting. The monolayers were then incubated at 37⁰C for 30 mn, 1 h, 2 h or 3 h in a 5% CO₂ atmosphere. After the incubation, the monolayers were washed three times with Hanks buffered salt solution (HBSS) and then incubated for an additional 1h in tissue culture medium containing 15 µg of gentamycin per ml to kill extracellular bacteria. The monolayers were then washed three times in HBSS and lysed with a 1% Triton X-100 solution for the recovery of bacteria. The number of bacteria surviving gentamycin treatment represented intracellular or invasive bacteria. Intracellular bacteria were quantified by spreading dilutions of the lysate onto L agar plates. The sensitivity of the killing effect of gentamycin was tested by treating an aliquot of the original bacterial suspension with the same concentration of antibiotic as used in the experiments. *E. coli* 424 and *S. typhimurium* were used as invasive controls, and *E. coli* HB101 as a negative control.

The data points presented in the figures and tables are average values (\pm range) from triplicate wells of a single experiment and are representative of values obtained in replicate experiments.

Production of antisera in rabbits

Polyclonal antibodies were generated against purified F165₁ and F165₂ fimbriae of strains *E. coli* HB101(pCJ7) and HB101(pYvan) respectively, by injecting 10 µg aliquots of purified proteins into rabbits as described by Harel et al. (15).

Isolation of fimbriae, PAGE and immunoblotting

Crude fimbrial extracts were prepared from strains used in the experiments, as described previously (9). After boiling the fimbrial samples for 5 min in 10 mM Tris/HCl (pH 7.8) containing 4% (w/v) SDS, 0.01 ml β-mercaptoethanol, 0,2 ml

glycerol and 0.002% bromophenol blue, the samples were run on slab gels as described previously (Harel, et al., 1992). Western blotting (immunoblotting) was carried out according to the method of Towbin et al. (31). Crude fimbrial extracts were electrophoresed on SDS polyacrylamide gels. Following transfer to nitrocellulose filters, the electrophoresed preparations were reacted with rabbit anti-F165₁ or anti-F165₂ fimbriae sera to identify the fimbrial bands.

Results

Detection of F165₁ and F165₂ fimbrial antigens

Polyclonal antibodies against purified F165₁ and F165₂ fimbriae from strains *E. coli* HB101(pCJ7) and HB101(pYvan) respectively, were used to analyze the expression of fimbriae F165₁ and F165₂ in the different wild type, mutants and recombinants strains. Using anti-F165₁ serum in Western blot, wild type strains 5131 and 4787, as well as 5131 derivative mutant 2 (*pstC::TnphoA*) and HB101(pCJ7), demonstrated one band of 18,5 kDa, corresponding to F165₁ fimbrial antigen (Fig. 1a). F165₁ negative mutant M48 (*fooA::TnphoA*) derivative of strain 5131, strain HB101(pYvan), and the negative control HB101 did not react with anti- F165₁ serum.

Wild type strains 5131 and 4787, mutants 2 and M48, and HB101 (pYvan) demonstrated a band of 17,5 kDa, corresponding to F165₂ fimbrial antigen on Western blot using anti-F165₂ serum (Fig. 1b). No band was observed for strains HB101 (pCJ7) and HB101 using anti-F165₂ serum.

Adherence assay

Bacterial adhesion and invasion data in the Table 2 and Figure 2 are represented using LLC-PK1 and MDCK-II cells, since adhesion was not observed using HeLa cell line. When epithelial cells were incubated with bacteria at a concentration of up to 1000:1 (bacteria/cell), lysis of some epithelial cells was observed. Adhesion could be observed, using lower ratio of bacteria (ratio 10:1 up

to 100:1). The time course of adhesion indicated that the adherence was optimal at 2 hours (data not shown). Our assay was standardized as a 2 hours incubation period, and a bacteria/cell ratio of 100:1. The adherence of bacteria was expressed as the number of bacteria for 100 cells. The type of adherence was diffuse, with a low number of bacteria per cell in most of case (less than 1 bacteria per cell); but in some area of the monolayer, we observe a concentration of bacteria (more than 5 bacteria per cell).

The wild type strains expressing F165₁ and F165₂ fimbriae (5131 and 4787) showed a higher degree of adhesion compared to the negative control HB101 (Fig. 2). Strain 4787 was more adherent in both cell lines than 5131 when a lower ratio of bacteria/cell was used, up to two fold higher. As shown in Figure 2, F165₁-negative mutant M48 and the avirulent mutant 2 were adherent to LLC-PK-I but to MDCK-II cells, in comparison with the wild type parent strain 5131 and the wild type strain 4787.

Strain HB101(pCJ7) which expresses the cloned F165₁ determinant, showed greater adherence to MDCK-II cells than to LLC-PK1 cells, and in both cell lines, greater adherence than for strain HB101(pYvan) which expressed F165₂ fimbriae. Strain HB101 (pYvan) showed a similar degree of adherence to both cell lines.

Strain 424 is known to adhere to and invade MDCK-II cells (19). As observed in the Figure 1, this strain showed a higher level of adherence when compared with the wild type strains 4787 and 5131. This strain was used as a positive control for the adherence assay.

Invasion assay

The invasion of epithelial cells by the different bacterial strains was investigated by adding gentamycin to monolayers (MDCK-II and LLC-PK1 cells) infected with bacteria, and measuring bacterial survival. The sensitivity of the bacteria to different concentrations of gentamycin was first verified. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of gentamycin in tissue culture medium was determined to be less than 1,5 µg/ml for all the strains examined, with the exception of *E. coli* 424, for which a concentration of 15 µg/ml was

shown to have bactericidal effect (19). Thus, this concentration was used in further invasion assays.

The invasive phenotype was measured as the percentage of initial inoculum surviving treatment with gentamycin (19). Neither the wild F165-positive strains nor the recombinant strains were shown to be invasive. Positive controls *S. typhimurium*, and the strain 424 were found to be invasive, with an invasion of 2,9% and 0,83% respectively (Table 2).

TABLE 1. Bacterial strains used in the study

Bacteria	Strain	Characteristics	Reference/ Source
			(11)
<i>E. coli</i> 5131	Wild type	Expresses F165 ₁ and F165 ₂ , Col V & aerobactin +	(11)
<i>E. coli</i> 4787	Wild type	Expresses F165 ₁ and F165 ₂ , Col V & aerobactin +	(11)
<i>E. coli</i> HB101		Negative control	(1)
<i>E. coli</i> HB101 (pCJ7)	Recombi- nant	Contains the <i>foo</i> gene cluster encoding F165 ₁	(15)
<i>E. coli</i> HB101 (pYvan)	Recombi- nant	Contains the <i>fof</i> gene cluster encoding F165 ₂	(16)
Mutant M48	5131 derivative obtained by transposon mutagenesis	(<i>fooA</i> ::Tn <i>phoA</i>) serum resistant, *MRHA ⁻	(14)
Mutant 2	5131 derivative obtained by transposon mutagenesis	(<i>pstC</i> ::Tn <i>phoA</i>) Avirulent, serum sensitive, *MRHA ⁺	(14)
<i>S.</i> <i>typhimurium</i>		Invasion positive control	ATCC 14028
<i>E. coli</i> 424	Wild type	Invasion positive control	(19)

*MRHA: Mannose-resistant hemagglutinating

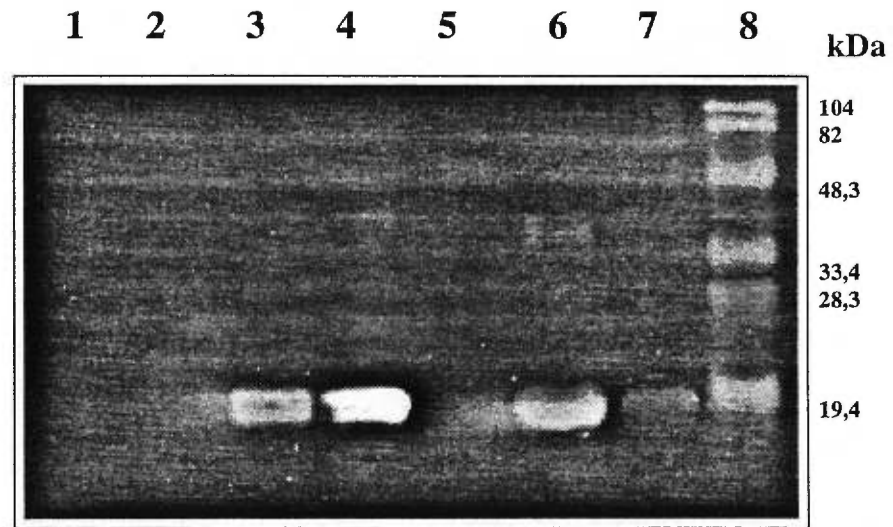


Fig. 1a Immunoblotting of fimbrial extracts with anti- F165₁ antiserum. (lane 1) *E. coli* HB101, (lane 2) *fooA*::*TnphoA* mutant M48, (lane 3) *pstC*::*TnphoA* mutant 2, (lane 4) recombinant strain *E. coli* HB101 (pCJ7) encoding F165₁, (lane 5) recombinant strain *E. coli* HB101 (pYvan) encoding F165₂, (lane 6) wild-type *E. coli* 5131, (lane 7) wild-type *E. coli* 4787, (lane 8) standard.

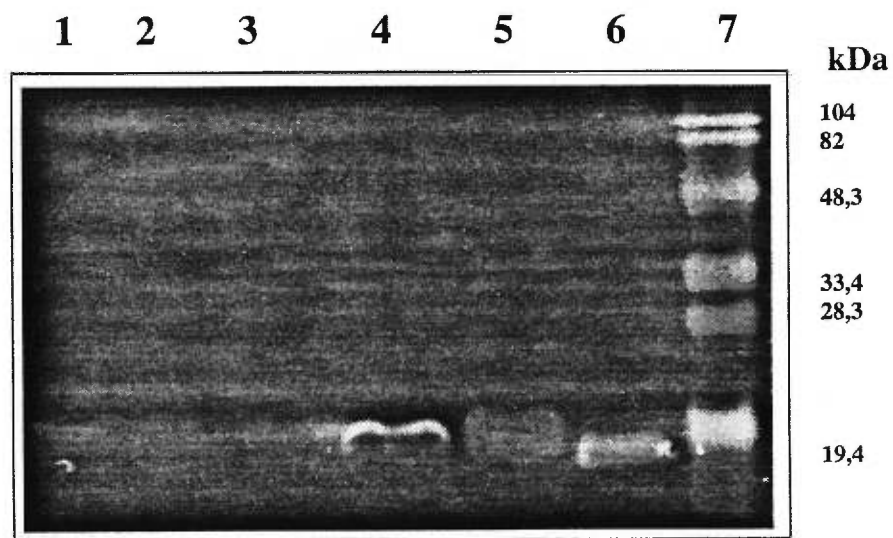


Fig. 1b Immunoblotting of fimbrial extracts with anti- F165₂ antiserum. (lane 1) *fooA*::*TnphoA* mutant M48, (lane 2) *pstC*::*TnphoA* mutant 2, (lane 3) recombinant strain *E. coli* HB101 (pCJ7) encoding F165₁, (lane 4) recombinant strain *E. coli* HB101 (pYvan) encoding F165₂, (lane 5) wild-type *E. coli* 5131, (lane 6) wild-type *E. coli* 4787, (lane 7) standard.

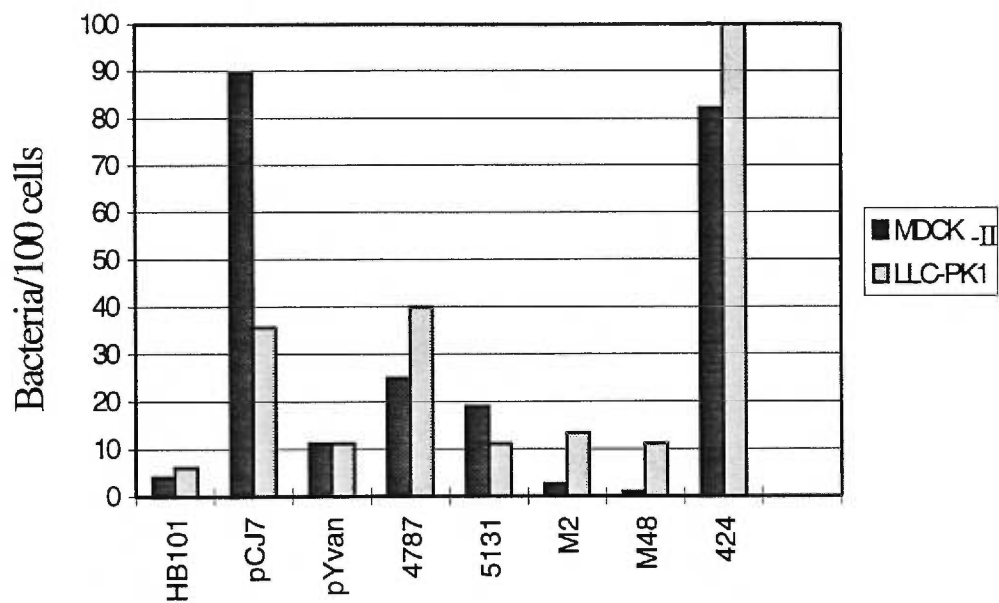


Figure 2- Adherence of *E. coli* strains on MDCK-II and LLC-PK1 monolayers after 2 hours incubation (bacteria/cell: 100:1)

TABLE 2. Bacterial invasion of and adherence to MDCK-II monolayers

Bacterial strain	Adherence ^a phenotype	Avg % ^b invasion \pm SD
<i>E. coli</i> 5131	+	0,005 \pm 0,007
<i>E. coli</i> 4787	+	0,005 \pm 0,007
<i>E. coli</i> 424	+	0,83 \pm 0,35
<i>S. Typhimurium</i>	ND	2,9 \pm 0,45
<i>E. coli</i> HB101	-	0,005 \pm 0,006
HB101(pCJ7)	+	0,005 \pm 0,006
HB101(pYvan)	\pm	0,005 \pm 0,006
M48	-	0,005 \pm 0,006
M2	-	0,005 \pm 0,006

a: Avg %: average number (\pm range) of bacteria surviving gentamycin treatment.

b: Adherence + = positive for adherence
 - = negative for adherence
 \pm = weekly positive for adherence

Discussion and conclusion

E. coli are able to cause extraintestinal infections, such as urinary tract infections (UTI), sepsis and newborn meningitis (27, 30). The fimbriae gene clusters of extraintestinal *E. coli*, such as P, S, or F1C fimbriae, possess minor subunit proteins which represent the hemagglutinating adhesins (13). It is known that the adherence of bacteria often mediated by fimbrial adhesin, and penetration of epithelial mucosa, are a key virulence factor and the first step in the disease process of many pathogenic bacteria (6).

In our study, we used cell culture to examine the adherence and invasiveness of *E. coli* 5131 and 4787 wild type strains, two F165₁ and F165₂-positive strains, and also derivative or mutants in genes involved in or associated with F165.

Strains expressing F165₁ and F165₂ fimbrial determinants were adherent to MDCK-II and LLC-PK1 cell lines but not to HeLa cells. No invasion phenotype was observed for these strains. The F165₁ defective mutant M48 is less adherent to MDCK-II cell line than its parental strain. It was shown previously that F165₁ fimbriae may have a role in extra-intestinal adherence allowing the colonization and survival of the bacteria in host tissues (25). It was also shown that survival of the wild type strain within PMNLs is at least partially due to the presence of F165₁ fimbriae (26). It appears in the condition of this study that F165₁ contributes more to the adherence than F165₂. Differential expression of the fimbriae has been observed (3), and this phenomenon as well as receptor specificities could also account for the adhesion phenotypes of the wild type strains.

Fimbriae F165₁ belongs to the P fimbriae family, which are important in uropathogenic *E. coli* strains. P fimbriae bind to Gal α (1-4)Gal-containing globoseries of glycolipids of epithelial cells, mediated by the lectin-like minor protein G of the filament (21). The tissue tropism of the G adhesins appears to be determined by the specific member of the globoseries of glycolipids expressed in different cell types and tissues. In previous study, it was demonstrated that the amino-terminus of PapG protein was responsible for adhesion specificity. F165₁ expresses a class III adhesin, and it was shown that monoclonal antibodies against the class III adhesin inhibited adherence of bacteria to cultured dog kidney cells (17). Previous study suggested that F165₁ fimbrial system may mediate adherence to polymorphonuclear leucocytes (PMNLs) *in vitro*, at higher level than afimbrial mutants (26).

Although less adherent than strains expressing F165₁, the recombinant strain expressing F165₂ alone adhere *in vitro*. F165₂ fimbriae belongs to the S family and the fimbrial subunits are homologous with F1C subunit proteins (16). Adherence to the renal tubular cell line LLC-PK1 was also shown for S and F1C fimbriae (23). F1C fimbriae do not mediate hemagglutinating activity, and their binding specificity has not been identified. However, it has been shown in frozen tissue sections that F1C fimbriae are able to bind to distal tubules and to collecting ducts of the kidney as well as to the vascular endothelial cells of kidney and bladder (32). In our study, a moderate binding ability was observed for F165₂ fimbriae with kidney cells of porcine origin *in vitro*. It is also another possibility to try endothelial cells for adherence study.

S-fimbrial adhesins are expressed by strains causing newborn meningitis (NBM) or UTI, and attach to glycoproteins terminating with α -sialyl-acid-2-3- β -galactosamine (12). They mediate *E. coli* binding to brain micro-vascular endothelial cells (BMEC) via SfaS and SfaA adhesins. Kim et al. (1995) have identified structures contributing to invasion into the central nervous system (CNS) from *E. coli* causing NBM (18). S fimbriae was required for adherence, but its presence was not accompanied by invasion (28). Another K88-related fimbrial antigen, fimbriae CS31A, which is associated with septicemic isolates in calves, was shown to be required for adherence but not for invasion *in vitro* (19). Fimbriae F165₁ and F165₂ could play a similar role.

The wild type derivative mutant 2, which has a *Tn_{phoA}* mutation in the *pst* operon, and is positive for both F165₁ and F165₂ fimbriae, showed a lower degree of adhesion than the wild type strains. The mutation in mutant 2 is pleiotropic, and the mutant is sensitive to the bactericidal effect of serum, and avirulent (4). Thus, the mutation could have an effect on the expression of adherence.

We have shown that F165₁ fimbriae expressing a group III G-adhesin, and to a lesser extent F165₂ fimbriae of the S family, are able to mediate bacterial adherence to cells of kidney origin *in vitro*, but do not appear to promote cell invasion. The role of F165₁ and F165₂ fimbriae in the pathogenicity of septicemic isolates, and how these strains gain the bloodstream needs to be further investigated.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Pierre Chaillier, Université de Sherbrooke Québec, for technical advices during this study, John Williford, Department of Microbiology, Washington University, for information on *E. coli* strain 424, and Christine Martin, Institut National de Recherche Agronomique France, for reviewing the manuscript.

This work was supported by a grant to J. H. from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

1. **Boyer, H. W., and D. Rolland-Dussoix.** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **41**:459-472.
2. **Casey, T. A., S. L. Moseley, and H. W. Moon.** 1990. Characterization of bovine septicemic, bovine diarrheal, and human enteroinvasive *Escherichia coli* that hybridize with K88 and F41 accessory gene probes but do not express these adhesins. *Microb. Pathog.* **8**:383-92.
3. **Daigle, F., C. M. Dozois, M. Jacques, and J. Harel.** 1997. Mutations in the *f165_{1A}* and *f165_{1E}* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb. Pathog.* **22**:247-52.
4. **Daigle, F., J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1995. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect. Immun.* **63**:4924-7.
5. **Dubreuil, J. D., and J. M. Fairbrother.** 1992. Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165₂. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**:219-224.
6. **Elsinghorst, E. A., L. S. Baron, and D. J. Kopecko.** 1989. Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**:5173-7.
7. **Fairbrother, J., J. Harel, C. Forget, C. Desautels, and J. Moore.** 1993. Receptor binding specificity and pathogenicity of *Escherichia coli* F165-positive strains isolated from piglets and calves and possessing pap related sequences. *Can. J. Vet. Res.* **57**(1):53-5.
8. **Fairbrother, J. M., A. Broes, M. Jacques, and S. Larivière.** 1989. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* **50**:1029-36.

9. **Fairbrother, J. M., R. Lallier, L. Leblanc, M. Jacques, and S. Larivière.** 1988. Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. FEMS Microbiol. Lett. **56**:247-252.
10. **Fairbrother, J. M., S. Larivière, and W. M. Johnson.** 1988. Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. Am. J. Vet. Res. **49**:1325-8.
11. **Fairbrother, J. M., S. Larivière, and R. Lallier.** 1986. New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. Infect. Immun. **51**:10-5.
12. **Hacker, J.** 1990. Genetic determinants coding for fimbriae and adhesions of extra-intestinal *Escherichia coli*. Curr. Top. Microbiol. Immun. **151**:1-27.
13. **Hacker, J., H. Kestler, H. Hoschutzky, K. Jann, F. Lottspeich, and T. K. Korhonen.** 1993. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. Infect. Immun. **61**:544-50.
14. **Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. J. Gen. Microbiol. **138**:2337-45.
15. **Harel, J., C. Forget, J. Saint-Amand, F. Daigle, D. Dubreuil, M. Jacques, and J. Fairbrother.** 1992. Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165₁, a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol. **138**:1495-502.
16. **Harel, J., M. Jacques, J. M. Fairbrother, M. Bosse, and C. Forget.** 1995. Cloning of determinants encoding F165₂ fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. Microbiol. **141**:221-8.
17. **Haslam, D. B., T. Boren, P. Falk, D. LLver, A. Chou, Z. Chu, and S. Normark.** 1994. The amino-terminal domain of the P-pilus adhesin determines receptor specificity. Mol. Microbiol. **14**:399-409.
18. **Huang, S. H., C. Wass, Q. Fu, N. V. Prasadarao, M. Stins, and K. S. Kim.** 1995. *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in*

vitro and *in vivo*: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. Infect. Immun. **63**:4470-5.

19. **Korth, M. J., J. C. Lara, and S. L. Moseley.** 1994. Epithelial cell invasion by bovine septicemic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **62**:41-7.

20. **Korth, M. J., R. A. Schneider, and S. L. Moseley.** 1991. An F41-K88-related genetic determinant of bovine septicemic *Escherichia coli* mediates expression of CS31A fimbriae and adherence to epithelial cells. Infect. Immun. **59**:2333-40.

21. **Lund, B., F. Lindberg, B. I. Marklund, and S. Normark.** 1987. The PapG protein is the alpha-D-galactopyranosyl-(1-4)-beta-D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**:5898-5902.

22. **Maiti, S. N., L. DesGroseillers, J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1994. Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165₁ of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. Microb. Pathog. **16**:15-25.

23. **Marre, R., B. Kreft, and J. Hacker.** 1990. Genetically engineered S and F1C fimbriae differ in their contribution to adherence of *Escherichia coli* to cultured renal tubular cells. Infect. Immun. **58**:3434-7.

24. **Ngeleka, M., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1992. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. Infect. Immun. **60**:5048-56.

25. **Ngeleka, M., M. Jacques, B. Martineau-Doize, F. Daigle, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 1993. Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165₁ fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. Infect. Immun. **61**:836-43.

26. **Ngeleka, M., B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1994. Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F165₁ resists killing by

porcine polymorphonuclear leukocytes *in vitro*: role of F165₁ fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infect. Immun.* **62**:398-404.

27. **Orskov, I., and F. Orskov.** 1985. *Escherichia coli* in extraintestinal infections. *J. Hyg.* **95**:551-575.

28. **Prasadarao, N. V., C. A. Wass, and K. S. Kim.** 1996. Endothelial cell GlcNAc beta(1-4)GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **64**:154-60.

29. **Prasadarao, N. V., C. A. Wass, J. N. Weiser, M. F. Stins, S. H. Huang, and K. S. Kim.** 1996. Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**:146-53.

30. **Sussman, M.** 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease, p. 7-45. *In* M. Sussman (ed.), *The virulence of Escherichia coli: reviews and methods.* Academic Press, Inc., New York.

31. **Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **78**:4350-4354.

32. **Virkola, R., B. Westerlund, H. Holthofer, J. Parkkinen, M. Kekomaki, and T. K. Korhonen.** 1988. Binding characteristics of *Escherichia coli* adhesins in human urinary bladder. *Infect. Immun.* **56**:2615-22.

IV- DISCUSSION ET CONCLUSION

L'adhérence bactérienne, souvent médiée par des adhésines fimbriaires, joue un rôle important dans l'étape primaire du processus infectieux de plusieurs bactéries pathogènes, en particulier lors du phénomène d'invasion de certaines bactéries (Elsinghorst, Baron & Kopecko, 1989). Chez les souches de *E. coli* extra-intestinal, les fimbriae P, S, ou F1C ont été bien étudiés. Chez les fimbriae P, l'adhésine G détermine la spécificité de liaison et se lie au récepteur Gal α (1-4)Gal, des cellules épithéliales. Les adhésines des fimbriae S, exprimées en particulier par des souches causant la méningite du nouveau-né (NBM), adhèrent aux récepteurs contenant le groupement acide sialique par l'intermédiaire de la protéine SfaS (Morschhauser *et al.*, 1993). Chez les souches de *E. coli* causant la méningite du nouveau-né, les sous-unités fimbriaires SfaS et SfaA médient l'adhérence *in vitro* aux cellules de l'endothélium micro-vasculaire du cerveau (Prasadarao *et al.*, 1997).

Pour comprendre la pathogénie des septicémies induites par *E. coli*, des études *in vitro* utilisant des lignées cellulaires ont été utilisées. Le groupe de Kim *et al.* a identifié des structures contribuant à l'invasion du système nerveux central chez des souches de *E. coli* causant des NBM. Le gène *ibe10* serait nécessaire au phénomène d'invasion (Huang *et al.*, 1995), et le fimbriae S à l'adhésion. Par ailleurs, il a été démontré que le fimbriae CS31A, associé à des septicémies chez les veaux, serait nécessaire pour l'adhésion des souches pathogènes aux cellules épithéliales et non pas pour l'invasion (Korth, Lara & Moseley, 1994). Dans l'exemple classique d'une espèce invasive, *Salmonella typhimurium*, on a démontré le rôle important des adhésines fimbriaires dans l'interaction avec les cellules, conduisant à l'invasion cellulaire. Non seulement elles auraient un rôle dans l'étape initial de colonisation, mais contribueraient au tropisme tissulaire des plaques de Peyer (Baumler, Tsolis & Heffron, 1996; Baumler, Tsolis & Heffron, 1997). De même sur la lignée cellulaire HEP-2, l'adhésion fimbriaire serait un pré-requis à l'invasion cellulaire de *Salmonella* (Baumler *et al.*, 1996).

Dans notre étude, on a utilisé des lignées cellulaires pour examiner l'adhérence et l'invasion des souches de *E. coli* 5131 et 4787, qui expriment les fimbriae F165₁ et F165₂, ainsi que des mutants dans les gènes associés à l'expression et/ou à l'adhésion médiées par le fimbriae F165. Les fimbriae F165₁ et F165₂ sont exprimés chez les souches de *E. coli* de séro-groupe O115 isolés de porcelet diarrhéique ou septicémique (Fairbrother *et al.*, 1988a). Nous avons étudié les différents patrons d'adhérence et d'invasion des souches exprimant les fimbriae F165₁ ou/et F165₂ chez différentes lignées cellulaires: HeLa, MDCK-II et LLC-PK1.

Les souches exprimant les deux fimbriae F165₁ et F165₂ sont adhérentes sur les lignées cellulaires MDCK-II et LLC-PK-1, et non pas sur HeLa, dans nos modèles expérimentaux. Par contre, elles sont non-invasives avec ces lignées cellulaires. Le fimbriae F165₁ contribue à une plus grande adhérence comparé à F165₂ selon notre modèle expérimental. Il a été démontré dans des travaux précédents que le fimbriae F165₁ aurait un rôle dans l'adhérence extra-intestinal des organes de l'hôte, permettant ainsi la colonisation et la survie des bactéries dans les tissus (Ngeleka *et al.*, 1993). Chez des porcelets infectés expérimentalement avec la souche parentale et le mutant M48 (*fooA::TnphoA*) qui n'exprime pas le fimbriae F165₁, on avait démontré que ce dernier se retrouvait en plus faible quantité que la souche sauvage 24-48 heures après l'inoculation. De même, l'interaction de la souche parentale avec des leucocytes polymorphonucléaires (PMNLs) de porc a permis de démontrer que sa survie dans les PMNLs est partiellement due grâce à la présence du fimbriae F165₁ (Ngeleka *et al.*, 1994). Dans notre étude *in vitro*, on a observé que le mutant M48, dérivé de la souche sauvage 5131, était moins adhérent aux cellules MDCK-II et LLC-PK1.

Le fimbriae F165₁ appartient à la famille des P fimbriae, et possède une adhésine G de classe III similaire à Prs, et qui se lie au récepteur Gal α (1-4)Gal des glycolipides. Le tropisme tissulaire des adhésines G est déterminé par la nature des globosérines des glycosphingolipides exprimés chez les différents types cellulaires et tissulaires. Il a été démontré dans des travaux précédents que l'extrémité amino-

terminale de la protéine PapG était responsable de la spécificité de l'adhésine (Haslam *et al.*, 1994). De même, des anticorps monoclonaux dirigés contre les adhésines de classe III inhibaient l'adhérence des bactéries sur culture cellulaire de rein d'origine canine.

Le mutant 2, qui exprime les fimbriae F165₁ et F165₂, présente une plus faible adhérence comparativement à la souche parentale. La mutation dans l'opéron *pst* chez le mutant 2 est pléiotropique, et pourrait aussi affecter l'expression de l'adhésion. On a démontré que ce mutant ne produisait pas de signe clinique et était éliminé de la circulation sanguine chez des porcelets infectés expérimentalement (Daigle, Fairbrother & Harel, 1995).

Si le fimbriae F165₁ joue un rôle dans l'adhérence, son importance dans la pathogénie et dans les différentes étapes de colonisation n'est pas encore bien compris. Moins adhérent que le fimbriae F165₁, le fimbriae F165₂ pourrait aussi contribuer à l'adhérence de *E. coli*, mais son rôle exact dans la colonisation n'est pas très clair. Ce fimbriae appartient à la famille des fimbriae S, et présente une forte homologie avec les fimbriae F1C, qui sont associés aux souches de *E. coli* uropathogènes. Les fimbriae F1C adhèrent aux cellules LLC-PK1, mais actuellement aucun récepteur n'a été identifié (Marre *et al.*, 1990).

La capacité de traverser l'épithélium intestinal peut être un important mécanisme de virulence dans la pathogénie des colibaciloses septicémiques. Dans notre étude *in vitro*, aucune des souches n'est invasive. Par contre, la souche septicémique de *E. coli* 424, exprimant le fimbriae CS31A, est invasive sur la lignée cellulaire MDCK-II. Mais ce fimbriae ne semble pas jouer un rôle dans l'invasion et le mécanisme de pathogénie de cette souche septicémique n'est pas encore bien élucidé (Korth *et al.*, 1994). Il est intéressant de noter que Fairbrother *et al.* avaient observé une présence élevée de bactéries F165-positives dans la séreuse des animaux infectés (Fairbrother *et al.*, 1989). Des études ultérieures, utilisant des cellules de la séreuse et des souches F165-positives dans des tests d'adhésion et d'invasion,

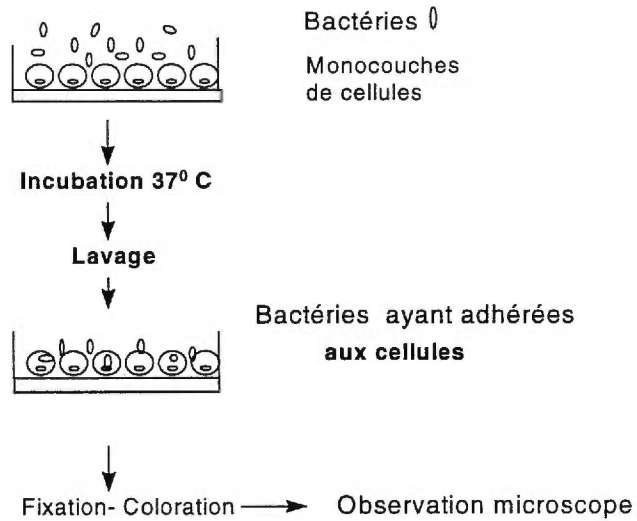
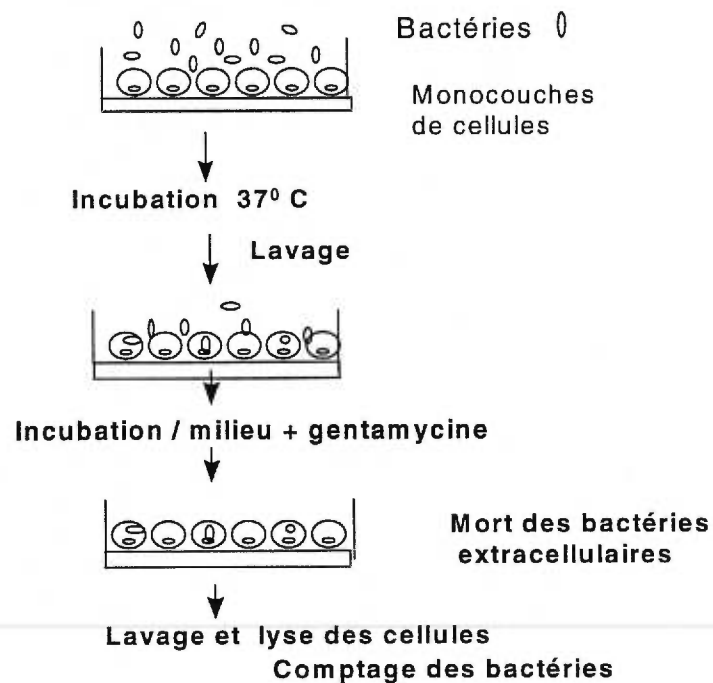
pourraient peut-être déterminer s'il existe une relation entre ce tissu et les bactéries F165-positives.

La pathogénie des septicémies à *E. coli* est un processus complexe faisant intervenir une grande variété de mécanismes de virulence. Les adhésines fimbriaires, dont la production exige un haut niveau d'activité métabolique, sont seulement produites dans des circonstances spéciales, et répondent à certaines conditions environnementales (Schmoll *et al.*, 1990). Ces adhésines peuvent être produites par différents déterminants génétiques d'un seul pathogène, qui ont la capacité d'influencer l'expression des uns et des autres ("cross-talk").

En conclusion, nous avons montré la capacité des souches possédant le fimbriae F165₁ exprimant l'adhésine G de groupe III, et le fimbriae F165₂ appartenant à la famille S, d'adhérer aux lignées cellulaires MDCK-II et LLC-PK1, ainsi que la capacité d'adhérence plus faible de F165₂ en comparaison avec F165₁. Aucune des souches étudiée n'est invasive dans notre modèle *in vitro*. Le rôle de ces fimbriae dans la pathogénie des souches septicémiques, et le mécanisme par lequel les souches de *E. coli* O115:K"V165":F165⁺ traversent la barrière intestinale et se retrouvent dans le système circulatoire n'est pas encore élucidé.

V- ANNEXES

ANNEXE 1. Tests d'adhésion et d'invasion des souches bactériennes utilisées.

Test d'adhésion**Test d'invasion**

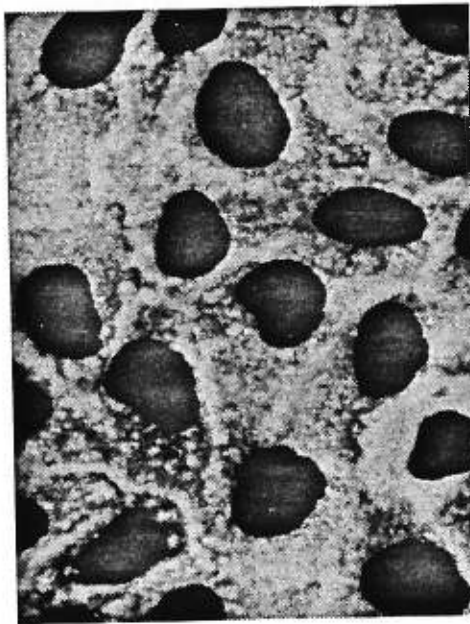
ANNEXE 2. Adhérence bactérienne aux cellules MDCK-II.

2a. cellules non infectées

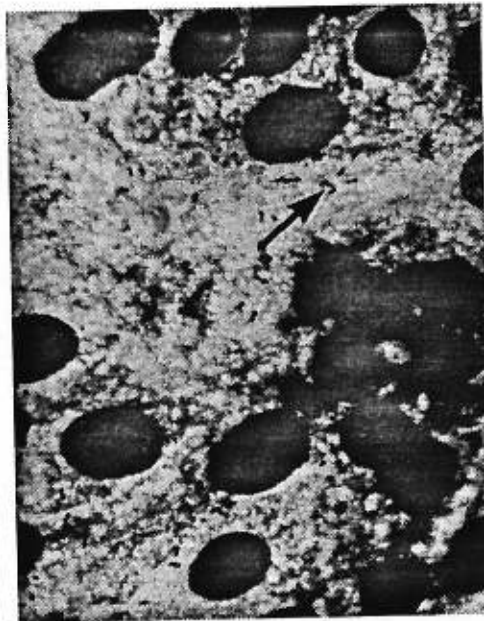
2b. cellules infectées avec *E. coli* 5131.

Les cellules sont fixées et colorées au Diff Quick et visualisées au microscope photonique.

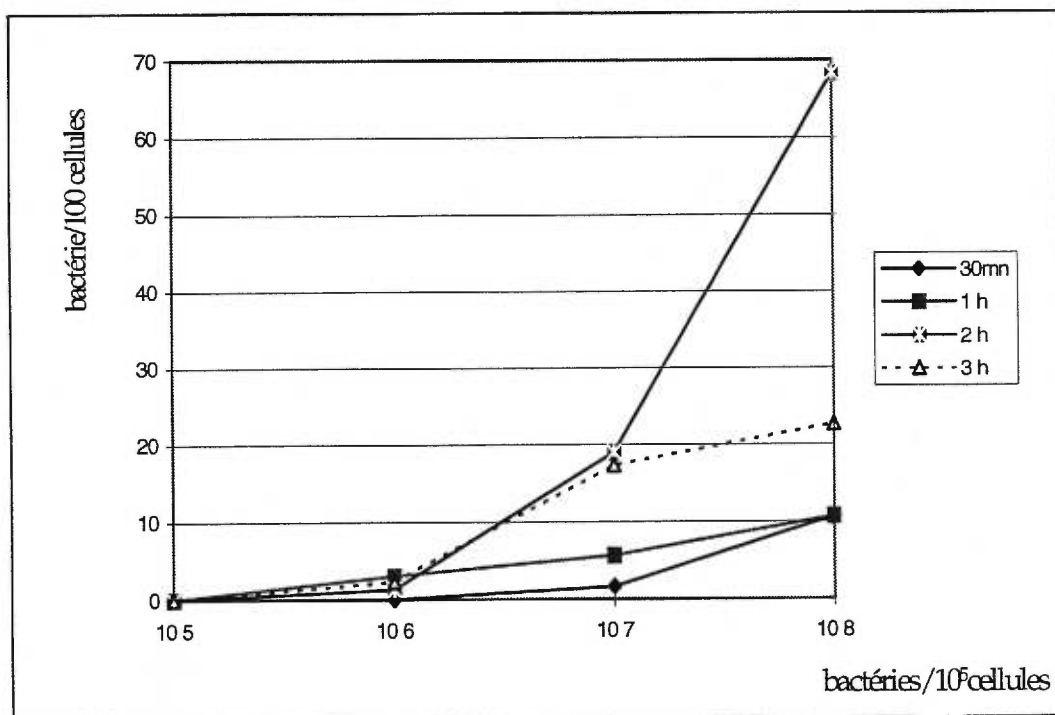
2a.



2b.



ANNEXE 3. Courbes d'adhérence de *E. coli* 5131 sur les cellules MDCK-II à des intervalles de temps différents en fonction de différentes concentrations bactériennes.



VI- BIBLIOGRAPHIE

- Aguero, M. E., de la Fuente, G., Vivaldi, E. & Cabello, F. (1989). ColV increases the virulence of *Escherichia coli* K1 strains in animal models of neonatal meningitis and urinary infection. *Med. Microbiol. Immunol.* **178**, 211-6.
- An, H., Fairbrother, J. M., Dubreuil, J. D. & Harel, J. (1997). Cloning and characterization of the *eae* gene from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. *FEMS Microbiol. Lett.* **148**, 239-245.
- Bailey, M. J., Koronakis, V., Schmoll, T. & Hughes, C. (1992). *Escherichia coli* HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the *rfaH* (*sfrB*) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. *Mol. Microbiol.* **6**, 1003-12.
- Bauer, M. E. & Welch, R. A. (1997). Pleiotropic effects of a mutation in *rfaC* on *Escherichia coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **65**, 2218-24.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M. & Heffron, F. (1996). Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**, 1862-5.
- Baumler, A. J., Tsolis, R. M. & Heffron, F. (1997). Fimbrial adhesins of *Salmonella typhimurium*. Role in bacterial interactions with epithelial cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* **412**, 149-58.
- Beachey, E. H. (1988). Bacterial adherence. In *Molecular mechanisms of microbial adhesion* (ed. L. Switalski), pp. 1-4. Springer-Verlag, New York.
- Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J. M. & Harel, J. (1996). Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 144-8.
- Benz, I. & Schmidt, M. A. (1993). Diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains processing of AIDA-I. *Zbl. Bakt.* **278**, 197-208.

- Bertin, Y., Martin, C., Oswald, E. & Girardeau, J. P. (1996). Rapid and specific detection of F17-related pilin and adhesin genes in diarrheic and septicemic *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J. Clin. Microbiol.* **34**, 2921-8.
- Betts, J., and B. B. Finley. (1992). Identification of *Salmonella typhimurium* invasiveness loci. *Can. J. Microbiol.* **38**, 852-857.
- Binns, M. M., Mayden, J. & Levine, R. P. (1982). Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. *Infect. Immun.* **35**, 654-659.
- Blum, G., Marre, R. & Hacker, J. (1995). Properties of *Escherichia coli* strains of serotype O6. *Infection* **23**, 234-6.
- Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H. & Hacker, J. (1994). Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* **62**, 606-14.
- Blumenstock, E. & Jann, K. (1982). Adhesion of piliated *Escherichia* strains to phagocytes: differences between bacteria with mannose-sensitive pili and those with mannose-resistant pili. *Infect. Immun.* **35**, 264-269.
- Bollmann, R., Seeburg, A., Parschau, J., Schonian, G., Sokolowska-Kohler, W., Halle, E. & Presber, W. (1997). Genotypic and phenotypic determination of five virulence markers in clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **17**, 263-71.
- Bullen, J. J. (1981). The significance of iron in infection. *Rev. Infect. Dis.* **3**, 1127-38.
- Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L. G., Ruggeri, F. M. & Zona, C. (1983). Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.* **39**, 1300-6.

- Caprioli, A., Falbo, V., Ruggeri, F. M., Baldassarri, L., Bisicchia, R., Ippolito, G., Romoli, E. & Donelli, G. (1987). Cytotoxic necrotizing factor production by hemolytic strains of *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *J. Clin. Microbiol.* **25**, 146-9.
- Cavaliere, S. J., Bohach, G. A. & Snyder, I. S. (1984). *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* **48**, 326-43.
- Cherifi, A., Contrepois, M., Picard, B., Gouillet, P., de Rycke, J., Fairbrother, J. & Barnouin, J. (1990). Factors and markers of virulence in *Escherichia coli* from human septicemia. *FEMS Microbiol. Lett.* **58**, 279-83.
- Cherifi, A., Contrepois, M., Picard, B., Gouillet, P., Orskov, I., Orskov, F. & De Rycke, J. (1991). Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O6 isolates from human and animal infections. *FEMS Microbiol. Lett.* **64**, 225-30.
- Contrepois, M., Fairbrother, J. M., Kaura, Y. K. & Girardeau, J. P. (1989). Prevalence of CS31A and F165 surface antigens in *Escherichia coli* isolates from animals in France, Canada and India. *FEMS Microbiol. Lett.* **50**, 319-23.
- Crosa, J. H. (1989). Genetics and molecular biology of siderophore-mediated iron transport in bacteria. *Microbiol. Rev.* **53**, 517-530.
- Cross, A. S. (1990). The biologic significance of bacterial encapsulation. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **150**, 87-95.
- Daigle, F., Dozois, C. M., Jacques, M. & Harel, J. (1997). Mutations in the *f165_{1A}* and *f165_{1E}* fimbrial genes and regulation of their expression in an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Microb. Pathog.* **22**, 247-52.
- Daigle, F., Fairbrother, J. M. & Harel, J. (1995). Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect. Immun.* **63**, 4924-7.

- de Graaf, F. K. & Gaastra, W. (1994). Fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. In *Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines* (ed. P. Klemm), pp. 57-88. CRC Press, Boca Raton.
- De Lorenzo, V. & Martinez, J. L. (1988). Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* **7**, 621-629.
- De Rycke, J., Gonzalez, E. A., Blanco, J., Oswald, E., Blanco, M. & Boivin, R. (1990). Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **28**, 694-9.
- Donnenberg, M. S. & Kaper, J. B. (1992). Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Imm.* **60**, 3953-3961.
- Donnenberg, M. S., Newman, B., Utsalo, S. J., Trifillis, A. L., Hebel, J. R. & Warren, J. W. (1994). Internalization of *Escherichia coli* into human kidney epithelial cells: comparison of fecal and pyelonephritis-associated strains. *J. Infect. Dis.* **169**, 831-8.
- Donnenberg, M. S., Tacket, C. O., James, S. P., Losonsky, G., Nataro, J. P., Wasserman, S. S., Kaper, J. B. & Levine, M. M. (1993). Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection [see comments]. *J. Clin. Invest.* **92**, 1412-7.
- Donnenberg, S. M. & Welch, R. A. (1996). Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management* Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* (ed. H. L. T. Mobley and J. W. Warren), pp. 135-174. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Dozois, C. M., Clement, S., Desautels, C., Oswald, E. & Fairbrother, J. M. (1997). Expression of P, S, and F1C adhesins by cytotoxic necrotizing factor 1-producing *Escherichia coli* from septicemic and diarrheic pigs. *FEMS Microbiol. Lett.* **152**, 307-12.

- Dozois, C. M., Fairbrother, J. M., Harel, J. & Bosse, M. (1992). *pap*-and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect. Immun.* **60**, 2648-2656.
- Dozois, C. M., Pourbakhsh, S. A. & Fairbrother, J. M. (1995). Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet. Microbiol.* **45**, 297-309.
- Dubreuil, J. D. (1997). *Escherichia coli* Stb enterotoxin. *Microbiol.* **143**, 1783-1795.
- Dubreuil, J. D. & Fairbrother, J. M. (1992). Biochemical and serological characterization of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165₂. *FEMS Microbiol. Lett.* **74**, 219-224.
- Duguid, J. P. & Old, D. C. (1980). Adhesive properties of *Enterobacteriaceae*. In *Bacterial adherence, receptors and recognition*. (ed. E. H. Beachey), pp. 186-217. Chapman and Hall, London.
- Duguid, J. P. & Old, D. C. (1994). Introduction: A historical perspective. In *Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines* (ed. P. Klemm), pp. 1-8. CRC Press, Boca Raton.
- Echeverria, P., Serichantalerg, O., Changchawalit, S., Baudry, B., Levine, M. M., Orskov, F. & Orskov, I. (1992). Tissue culture-adherent *Escherichia coli* in infantile diarrhea. *J. Infect. Dis.* **165**, 141-3.
- Elsinghorst, E. A., Baron, L. S. & Kopecko, D. J. (1989). Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **86**, 5173-7.

Elsinghorst, E. A. & Kopecko, D. J. (1992). Molecular cloning of epithelial cell invasion determinants from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**, 2409-17.

Evans, D. G., Evans, D. J., Jr., Clegg, S. & Pauley, J. A. (1979). Purification and characterization of the CFA/I antigen of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **25**, 738-48.

Fairbrother, J., Harel, J., Forget, C., Desautels, C. & Moore, J. (1993). Receptor binding specificity and pathogenicity of *Escherichia coli* F165-positive strains isolated from piglets and calves and possessing pap related sequences. *Can. J. Vet. Res.* **57**, 53-5.

Fairbrother, J. M., Broes, A., Jacques, M. & Larivière, S. (1989). Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* **50**, 1029-36.

Fairbrother, J. M., Lallier, R., Leblanc, L., Jacques, M. & Larivière, S. (1988a). Production and purification of *Escherichia coli* fimbrial antigen F165. *FEMS Microbiol. Lett.* **56**, 247-252.

Fairbrother, J. M., Larivière, S. & Johnson, W. M. (1988b). Prevalence of fimbrial antigens and enterotoxins in nonclassical serogroups of *Escherichia coli* isolated from newborn pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.* **49**, 1325-8.

Fairbrother, J. M., Larivière, S. & Lallier, R. (1986). New fimbrial antigen F165 from *Escherichia coli* serogroup O115 strains isolated from piglets with diarrhea. *Infect. Immun.* **51**, 10-5.

Falkow, S. (1996). The evolution of pathogenicity in *Escherichia*, *Shigella*, and *Salmonella*. In *Escherichia coli and Salmonella*, vol. 2 (ed. F. C. Neidhardt), pp. 2723-2729. ASM Press, Washington D.C.

Falkow, S., Isberg, R. R. & Portnoy, D. A. (1992). The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 333-63.

Falzano, L., Fiorentini, C., Donelli, G., Michel, E., Kocks, C., Cossart, P., Cabanie, L., Oswald, E. & Boquet, P. (1993). Induction of phagocytic behaviour in human epithelial cells by *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor type 1. *Mol. Microbiol.* **9**, 1247-54.

Finlay, B. B. & Siebers, A. (1995). Mechanisms of mucosal colonization and penetration by bacterial pathogens. In *Virulence mechanisms of bacterial pathogens* (ed. J. A. Roth), pp. 33-45. ASM Press, Washington D.C.

Gaastra, W. & De Graaf, F. K. (1982). Host specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* **46**, 129-161.

Galan, J. E. & Sansonetti, P. J. (1996). Molecular and cellular bases of *Salmonella* and *Shigella* interactions with host cells. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, vol. 2 (ed. F. C. Neidhardt), pp. 2757-2773. ASM Press, Washington D. C.

Garcia, E., Bergmans, H. E., Van den Bosch, J. F., Orskov, I., Van der Zeijst, B. A. & Gaastra, W. (1988). Isolation and characterisation of dog uropathogenic *Escherichia coli* strains and their fimbriae. *Antonie van Leeuwenhoek* **54**, 149-63.

Goldberg, M. B. & Sansonetti, P. (1993). *Shigella* subversion of the cellular cytoskeleton: a strategy for epithelial colonization. *Infect. Immun.* **61**, 4941-4946.

Gorby, G. L., Robinson, E. N., Jr., Barley, L. R., Clemens, C. M. & McGee, Z. A. (1988). Microbial invasion: a covert activity? *Can. J. Microbiol.* **34**, 507-512.

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

Gyles, C. L. (1986). *Escherichia coli*. In *Pathogenesis of bacterial infections in animals* (ed. C. L. Gyles). Iowa State University Press, Ames.

- Hacker, J. (1990). Genetic determinants coding for fimbriae and adhesions of extra-intestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **151**, 1-27.
- Hacker, J., Blum-Oehler, G., Muhldorfer, I. & Tschape, H. (1997). Pathogenicity islands of virulent bacteria. Structure, fonction and impact on microbial evolution (Review). *Mol. Microbiol.* **23**, 1089-1097.
- Hacker, J. & Morschhäuser, J. (1994). S and F1C fimbriae. In *Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines* (ed. P. Klemm), pp. 27-36. CRC Press Inc., Boca Raton.
- Harel, J., Fairbrother, J., Forget, C., Desautels, C. & Moore, J. (1993). Virulence factors associated with F165-positive *Escherichia coli* strains isolated from piglets and calves. *Vet. Microbiol.* **38**, 139-55.
- Harel, J., Forget, C., Ngeleka, M., Jacques, M. & Fairbrother, J. M. (1992a). Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 2337-45.
- Harel, J., Forget, C., Saint-Amand, J., Daigle, F., Dubreuil, D., Jacques, M. & Fairbrother, J. (1992b). Molecular cloning of a determinant coding for fimbrial antigen F165₁, a Prs-like fimbrial antigen from porcine septicaemic *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* **138**, 1495-502.
- Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J. M., Bosse, M. & Forget, C. (1995). Cloning of determinants encoding F165₂ fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiol.* **141**, 221-8.
-
- Hart, C. A., Batt, R. M. & Saunders, J. R. (1993). Diarrhea caused by *Escherichia coli*. *Ann. Trop. Paediat.* **13**, 121-31.

- Haslam, D. B., Boren, T., Falk, P., LLver, D., Chou, A., Chu, Z. & Normark, S. (1994). The amino-terminal domain of the P-pilus adhesin determines receptor specificity. *Mol. Microbiol.* **14**, 399-409.
- Huang, S. H., Wass, C., Fu, Q., Prasadarao, N. V., Stins, M. & Kim, K. S. (1995). *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells *in vitro* and *in vivo*: molecular cloning and characterization of invasion gene *ibe10*. *Infect. Immun.* **63**, 4470-5.
- Hultgren, S. J., Jones, C. H. & Normark, S. (1996). Bacterial adhesins and their assembly. In *Escherichia coli and Salmonella: cellular and molecular biology*, vol. 2 (ed. F. C. Neidhardt), pp. 2730-2756. ASM Press, Washington D. C.
- Jacobs, E. J. (1985). Overview of mediators affecting pulmonary and systemic vascular changes in endotoxemia. In *Pathophysiology of endotoxin*, vol. 2. *Handbook of endotoxin* (ed. L. B. Hinshaw), pp. 1-15. Elsevier Science Publishers P.V., New York.
- Jann, B. & Jann, K. (1990). Structure and biosynthesis of the capsular antigens of *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immun.* **150**, 19-42.
- Jann, K. & Jann, B. (1992). Capsules of *Escherichia coli*, expression and biological significance. *Can. J. Microbiol.* **38**, 705-10.
- Johnson, A. G. (1985). Modulation of antibody synthesis by bacterial endotoxins. In *Cellular biology of endotoxin*, vol. 3. *Handbook of endotoxin* (ed. L. S. Berry), pp. 216-224. Elsevier Science Publishers P.V.
- Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin. Microbiol. Rev.* **4**, 80-128.
- Johnson, J. R. & Brown, J. J. (1996). A novel multiply primed polymerase chain reaction assay for identification of variant papG genes encoding the Gal(alpha1-4)Gal-binding PapG adhesins of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **173**, 920-6.

- Joiner, K. A. (1988). Complement evasion by bacteria and parasites. *Ann. Rev. Microbiol.* **42**, 201-230.
- Jones, B., Pascopella, L. & Falcow, S. (1995). Entry of microbes into the host: using M cells to break the mucosal barrier. *Curr. Opin. Immunol.* **7**, 474-478.
- Kenny, B., Lai, L. C., Finlay, B. B. & Donnenberg, M. S. (1996). EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **20**, 313-23.
- Klemm, P. (1985). Fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Rev. Infect. Dis.* **7**, 321-340.
- Klemm, P. & Krogfelt, A. (1994). Type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. In *Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines* (ed. P. Klemm), pp. 9-26. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Korhonen, T. K., Virkola, R., Vaisanen-Rhen, V. & Holthofer, H. (1986). Binding of purified *Escherichia coli* 075X adhesin to frozen sections of human kidney. *FEMS Microbiol. Lett.* **35**, 313-318.
- Korhonen, T. K., Virkola, R., Westurlund, B., Holthofer, H. & Parkkinen, J. (1990). Tissue tropism of *Escherichia coli* adhesins in human extraintestinal infections. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**, 115-27.
- Korth, M. J., Lara, J. C. & Moseley, S. L. (1994). Epithelial cell invasion by bovine septicemic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **62**, 41-7.
- Krogfelt, K. A., Bergmans, H., and Klemm, P. (1990). Direct evidence that the FimH protein is the mannose specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect. Immun.* **58**, 1995.
- Kuehn, M. K., Haslam, D., Normark, S. & Hulgren, S. J. (1994). Structure, function, and biogenesis of *Escherichia coli* P pili. In *Fimbriae: Adhesion,*

Genetics, Biogenesis, and Vaccines (ed. P. Klemm), pp. 37-51. CRC press. Inc, Boca Raton.

Lai, L. C., Wainwright, L. A., Stone, K. D. & Donnenberg, M. S. (1997). A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect. Immun.* **65**, 2211-7.

Lee, C. A. (1996). Pathogenicity islands and the evolution of bacterial pathogens. *Infect. Ag. Dis.* **5**, 1-7.

Levine, M. M. (1987). *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* **155**, 377-89.

Low, D., Braaten, B. & Van Der Woude, M. (1996). Fimbriae. In *Escherichia coli and Salmonella* (ed. F. C. Neidhardt), pp. 146-157. ASM Press, Washington D. C.

Lund, B., B. I. Marklund, N. Strömberg, F. Lindberg, K. A. Karlsson and S. Normark. (1988). Uropathogenic *Escherichia coli* can express serologically identical pili of different receptor binding specificities. *Mol. Microbiol.* **2**, 255-263.

Lund, B., Lindberg, F., Marklund, B. I. & Normark, S. (1987). The PapG protein is the alpha-D-galactopyranosyl-(1-4)-beta-D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **84**, 5898-5902.

Maiti, S. N., DesGroseillers, L., Fairbrother, J. M. & Harel, J. (1994). Analysis of genes coding for the major and minor fimbrial subunits of the Prs-like fimbriae F165₁ of porcine septicemic *Escherichia coli* strain 4787. *Microb. Pathog.* **16**, 15-25.

Marre, R., Kreft, B. & Hacker, J. (1990). Genetically engineered S and F1C fimbriae differ in their contribution to adherence of *Escherichia coli* to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* **58**, 3434-7.

- May, A. K., Sawyer, R. G., Gleason, T., Whitworth, A. & Pruett, T. L. (1996). *In vivo* cytokine response to *Escherichia coli* alpha-hemolysin determined with genetically engineered hemolytic and nonhemolytic *E. coli* variants. *Infect. Immun.* **64**, 2167-71.
- McDaniel, T. K. & Kaper, J. B. (1997). A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol. Microbiol.* **23**, 399-407.
- McKee, M. L. & O'Brien, A. D. (1995). Investigation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adherence characteristics and invasion potential reveals a new attachment pattern shared by intestinal *E. coli*. *Infect. Immun.* **63**, 2070-4.
- McKee, M. L. & O'Brien, A. D. (1996). Truncated enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 intimin (EaeA) fusion proteins promote adherence of EHEC strains to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* **64**, 2225-33.
- Meccas, J. J. & Strauss, E. J. (1996). Molecular mechanisms of bacterial virulence: type III secretion and pathogenicity islands. *Emerg. Infect. Dis.* **2**, 270-88.
- Meier, C., Oelschlaeger, T. A., Merkert, H., Korhonen, T. K. & Hacker, J. (1996). Ability of *Escherichia coli* isolates that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 2391-9.
- Milon, A. (1993). Mécanismes moléculaires de pathogénicité des *Escherichia coli* inducteurs de diarrhées chez l'homme et l'animal. *Revue Méd. Vét.* **144**, 857-878.
- Mim's, C. A., Dimmock, N. J., Nash, A. & Stephen, J. (1995). *Mim's pathogenesis of infectious diseases*, 4 edition. Academic Press, London.
-
- Morris, J. A. & Sojka, W. J. (1985). *Escherichia coli* as pathogen in animal. In *The virulence of Escherichia coli: reviews and methods*. (ed. M. Sussman), pp. 47-77. Academic Press, Inc., London.

- Morschhauser, J., Vetter, V., Emody, L. & Hacker, J. (1994). Adhesin regulatory genes within large, unstable DNA regions of pathogenic *Escherichia Coli* - Cross-talk between different adhesin gene clusters. *Mol. Microbiol.* **11**, 555-566.
- Morschhauser, J., Vetter, V., Korhonen, T., Uhlin, B. E. & Hacker, J. (1993). Regulation and binding properties of S fimbriae cloned from *E. coli* strains causing urinary tract infection and meningitis. *Zbl. Bakt.* **278**, 165-76.
- Neilands, J. B. (1992). Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in *Escherichia coli* K12 (pColV-K30). *Can. J. Microbiol.* **38**, 728-733.
- Ngeleka, M., Jacques, M., Martineau-Doize, B., Daigle, F., Harel, J. & Fairbrother, J. M. (1993). Pathogenicity of an *Escherichia coli* O115:K"V165" mutant negative for F165I fimbriae in septicemia of gnotobiotic pigs. *Infect. Immun.* **61**, 836-43.
- Ngeleka, M., Martineau-Doize, B. & Fairbrother, J. M. (1994). Septicemia-inducing *Escherichia coli* O115:K"V165" F165₁ resists killing by porcine polymorphonuclear leukocytes *in vitro*: role of F165₁ fimbriae and K"V165" O-antigen capsule. *Infect. Immun.* **62**, 398-404.
- Oelschlaeger, T. A., J. Morschhauser, C. Meier, C. Schipper, and J. Hacker. (1996). Adhesion and invasion of *Escherichia coli*: studies on function and regulation. In *Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases* (ed. I. Kahane and I. Ofek), pp. 57-62. Plenum Press, New York.
- Oelschlaeger, T. A., Barrett, T. J. & Kopecko, D. J. (1994). Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 strains. *Infect. Immun.* **62**, 5142-50.
-
- Orskov, F. & Orskov, I. (1992). *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* **38**, 699-704.
- Orskov, I. & Orskov, F. (1985). *Escherichia coli* in extraintestinal infections. *J. Hyg.* **95**, 551-575.

- Orskov, I. & Orskov, F. (1990). Serologic classification of fimbriae. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**, 71-90.
- Oswald, E., Sugai, M., Labigne, A., Wu, H. C., Fiorentini, C., Boquet, P. & O'Brien, A. (1994). Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 3814-8.
- Ottow, J. C. G. (1975). Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**, 79-108.
- Palmer, L. M., Reilly, T. J., Utsalo, S. J. & Donnenberg, M. S. (1997). Internalization of *Escherichia coli* by human renal epithelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins. *Infect. Immun.* **65**, 2570-5.
- Parkkinen, J., Korhonen, T. K., Pere, A., Hacker, J. & Soinila, S. (1988). Binding sites in the rat brain for *Escherichia coli* S fimbriae associated with neonatal meningitis. *J. Clin. Inv.* **81**, 860-5.
- Parry, S. H. & Rooke, D. M. (1985). Adhesins and colonization factors of *Escherichia coli*. In *The virulence of Escherichia coli: Review and methods* (ed. M. Sussman), pp. 79-148. Academic Press, Inc., London.
- Pawelzik, M., Heesemann, J., Hacker, J. & Opferkuch, W. (1988). Cloning and characterization of a new type of fimbria (S/F1C-related fimbria) expressed by an *Escherichia coli* O75:K1:H7 blood culture isolate. *Infect. Immun.* **56**, 2918-24.
- Pramoonjago, P., Kaneko, M., Kinoshita, T., Ohtsubo, E., Takeda, J., Hong, K. S., Inagi, R. & Inoue, K. (1992). Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance. *J. Immunol.* **148**, 827-36.
- Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Hacker, J., Jann, K. & Kim, K. S. (1993). Adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to brain glycolipids mediated by *sfaA* gene-encoded protein of S-fimbriae. *J. Biol. Chem.* **268**, 10356-63.

- Prasadarao, N. V., Wass, C. A. & Kim, K. S. (1996a). Endothelial cell GlcNAc beta(1-4)GlcNAc epitopes for outer membrane protein A enhance traversal of *Escherichia coli* across the blood-brain barrier. *Infect. Immun.* **64**, 154-60.
- Prasadarao, N. V., Wass, C. A. & Kim, K. S. (1997). Identification and characterization of S fimbria-binding sialoglycoproteins on brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **65**, 2852-60.
- Prasadarao, N. V., Wass, C. A., Weiser, J. N., Stins, M. F., Huang, S. H. & Kim, K. S. (1996b). Outer membrane protein A of *Escherichia coli* contributes to invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 146-53.
- Quackenbush, R. L. & Falkow, S. (1979). Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **24**, 562-564.
- Rietschel, E. T., Labischinski, D. & Naumann, D. (1990). Bacterial lipopolysaccharides: relationship of structure and conformation to endotoxic activity, serological specificity and biological function. In *Endotoxin*, vol. 256. *Advances in experimental medicine and biology* (ed. H. Friedman, T. W. Klein, M. Nakano and A. Nowotny), pp. 81-99. Plenum Press, New York.
- Roberts, J. A., Marklund, B. I., Ilver, O., Haslam, D., Kaack, M. B., Baskin, G., Louis, M., Mollby, R., Winberg, J. & Normark, S. (1994). The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **91**, 11889-93.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S. & Finlay, B. B. (1996). Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**, 966-73.
- Salyers, A. A. & Whitt, D. D. (1994). *Escherichia coli* gastrointestinal infections. In *Bacterial pathogenesis: A molecular approach*. (ed. A. A. Salyers and D. D. Whitt), pp. 190-204. ASM Press, Inc., Washington, D.C.

- Savarino, S. J., Fasano, A., Watson, J., Martin, B. M., Levine, M. M., Guandalini, S. & Guerry, P. (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.
- Savarino, S. J., Fox, P., Deng, Y. & Nataro, J. P. (1994). Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. *J. Bacteriol.* **176**, 4949-57.
- Savarino, S. J., McVeigh, A., Watson, J., Cravioto, A., Molina, J., Echeverria, P., Bhan, M. K., Levine, M. M. & Fasano, A. (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. *J. Infect. Dis.* **173**, 1019-22.
- Scaletsky, I. C., Pedroso, M. Z. & Fagundes-Neto, U. (1996). Attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* O18ab invades epithelial cells and causes persistent diarrhea. *Infect. Immun.* **64**, 4876-81.
- Schmoll, T., J. Hacker, and W. Goebel. (1987). Nucleotide sequence of the *sfaA* gene coding for the S-fimbrial protein subunit of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**, 229-235.
- Schmoll, T., Ott, M., Oudega, B. & Hacker, J. (1990). Use of a wild-type gene fusion to determine the influence of environmental conditions on expression of the S fimbrial adhesin in an *Escherichia coli* pathogen. *J. Bacteriol.* **172**, 5103-11.
- Schnaitman, C. A. & Klena, J. D. (1993). Genetics of lipopolysaccharide biosynthesis in enteric bacteria. *Microbiol. Rev.* **57**, 655-682.
-
- Siitonen, A., Takala, A., Ratiner, Y. A., Pere, A. & Makela, P. H. (1993). Invasive *Escherichia coli* infections in children: bacterial characteristics in different age groups and clinical entities. *Ped. Infect. Dis. J.* **12**, 606-12.
- Smith, H. W. (1974). A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a

plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J. Gen. Microbiol.* **83**, 95-111.

Smyth, C. J., Marron, M. & Smith, S. G. J. (1994). Fimbriae of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in domestic animals and human* (ed. C. L. Gyles), pp. 399-435. CAB International, Wallingford.

Smyth, C. J. & Smith, S. G. J. (1992). Bacterial fimbriae: variation and regulatory mechanisms. In *Molecular biology of bacterial infection: current status and future perspective (Society for General Microbiology Symposium no.49)* (ed. C. H. Hormaeche, C. W. Penn and C. J. Smyth). Cambridge University Press., Cambridge.

Straube, E., Schmidt, G., Marre, R. & Hacker, J. (1993). Adhesion and internalization of *E. coli* strains expressing various pathogenicity determinants. *Zbl. Bakt.* **278**, 218-28.

Strömberg, N., Hultgren, D., Russel, D. G. & Normark, S. (1992). Microbial attachment, molecular mechanisms. In *Encyclopedia of Microbiology*, vol. 3, pp. 143-159. Academic Press, London.

Suhr, M., Benz, I. & Schmidt, M. A. (1996). Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* **22**, 31-42.

Sukupolvi, S. & O'Connor, C. D. (1990). TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiol. Rev.* **54**, 331-41.

Sussman, M. (1985). *Escherichia coli* in human and animal disease. In *The virulence of Escherichia coli: reviews and methods* (ed. M. Sussman), pp. 7-45. Academic Press, Inc., New York.

- Svanborg, C., Orskov, F. & Orskov, I. (1994). Fimbriae and disease. In *Fimbriae: Adhesion, Genetics, Biogenesis, and Vaccines* (ed. P. Klemm), pp. 239-254. CRC Press, Inc., Boca Raton.
- Taylor, P. W. (1983). Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* **47**, 46-83.
- Virkola, R., Parkkinen, J., Hacker, J. & Korhonen, T. K. (1993). Sialyloligosaccharide chains of laminin as an extracellular matrix target for S fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **61**, 4480-4.
- Wai, S. N., Takade, A. & Amako, K. (1996). The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **135**, 17-22.
- Wan, Y., Freeswick, P. D., Khemlani, L. S., Kispert, P. H., Wang, S. C., Su, G. L. & Billiar, T. R. (1995). Role of lipopolysaccharide (LPS), interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor, and dexamethasone in regulation of LPS-binding protein expression in normal hepatocytes and hepatocytes from LPS-treated rats. *Infect. Immun.* **63**, 2435-42.
- Warren, J. W. (1996). Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. In *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management* (ed. H. L. T. Mobley and J. W. Warren), pp. 3-27. ASM Press, Washington D.C.
- Waters, V. L. & Crosa, J. H. (1991). Colicin V virulence plasmids. *Microbiol. Rev.* **55**, 437-50.
- Welch, R. A., Dellinger, E. P., Minshew, B. & Falkow, S. (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* **294**, 665-7.
- Westerlund, B., Van Die, I., Hoekstra, W., Virkola, R., and T. K. Korhonen. (1993). P fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli* as multifunctional adherence organelles. *Zbl. Bakt.* **278**, 229-237.

- Yamamoto, T. & Echeverria, P. (1996). Detection of the enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 gene sequences in enterotoxigenic *E. coli* strains pathogenic for humans. *Infect. Immun.* **64**, 1441-5.
- Yamamoto, T., Wakisaka, N., Sato, F. & Kato, A. (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.
- Zhang, L. H., Fath, M. J., Mahanty, H. K., Tai, P. C. & Kolter, R. (1995). Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics* **141**, 25-32.
- Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M. S., Beaudry, M. & Fairbrother, J. M. (1994). Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect. Immun.* **62**, 4153-9.
-