

2 m 11. 3022.8

Université de Montréal

Caractérisation de Paa, un facteur impliqué dans la formation de lésions  
attachant-effaçant par *Escherichia coli*

par

MARIE-PIERRE GUIMOND

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Avril 2002

© Marie-Pierre Guimond, 2002



SF

607

U54

2002

V.017

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé

Caractérisation de Paa, un facteur impliqué dans la formation de lésions  
attachant-effaçant par *Escherichia coli*

présenté par

MARIE-PIERRE GUIMOND

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Sylvain Quessy, président-rapporteur

Josée Harel, directrice de recherche

John M. Fairbrother, codirecteur

Linda Saucier, membre du jury

## Résumé

Les souches de *Escherichia coli* attachant-effaçant (ou AEEC) ont la capacité de causer des lésions appelées attachant-effaçant (AE) dans l'intestin. Ce sont des lésions histopathologiques caractéristiques qui sont définies par l'attachement intime de la bactérie sur la surface des entérocytes et l'effacement des microvillosités de la cellule hôte. Des réarrangements du cytosquelette, dont un recrutement d'actine sous la bactérie adhérente, résultent en la formation d'une structure en forme de piédestal qui semble supporter la bactérie. Les gènes nécessaires à la formation des lésions sont encodés par un locus chromosomique, le LEE (locus for enterocyte effacement). Les souches porcines entéropathogènes (PEPEC) de sérotype O45 causent la diarrhée post-sevrage chez les porcelets et ont la capacité d'induire les lésions AE. La mutagenèse par transposition de la souche 86-1390 a permis d'identifier un nouveau facteur impliqué dans la formation des lésions. Ce gène de 753 pb, encodant une protéine de 27,6 kDa, a été nommé *paa* (porcine attaching-effacing associated gene). La région contenant *paa* est insérée entre *yciD* et *yciE* à 28,3 minutes par rapport au chromosome de *E. coli* K-12. La protéine Paa possède des identités de 100% avec Paa des souches EHEC EDL933 et Sakai, 51,8% avec PEB3 de *Campylobacter jejuni* et 49% avec AcfC de *Vibrio cholerae*. La protéine contient aussi un domaine de liaison au sulfate, comme plusieurs protéines bactériennes associées à l'adhérence à la cellule-hôte. La fusion Paa::PhoA est retrouvée principalement en association avec le culot bactérien. Chez les souches PEPEC O45, il y a une corrélation entre la présence de *paa* et d'*eae*, et la capacité de former des lésions AE. Paa semble impliqué dans les premières étapes de l'infection, soit l'adhérence.

Mots clés : *E. coli*, souches porcines, lésions attachant-effaçant, *paa* (porcine attaching and effacing associated gene), adhésion

## Abstract

Attaching and effacing *E. coli* strains (AEEC) cause attaching and effacing (AE) lesions in the intestine. The lesions are characterized by intimate bacterial adhesion to enterocytes, localized destruction of brush border microvilli and accumulation of polymerized actin beneath the attached bacteria that results in the formation of a pedestal structure in the enterocyte membrane. The genes necessary for the formation of AE lesions are localized on a chromosomal pathogenicity island named LEE (locus for enterocyte effacement). Enteropathogenic porcine *E. coli* strains belonging to the serogroup O45 have been associated with postweaning diarrhea in swine and induce AE lesions. By transposon insertion mutagenesis on PEPEC O45 strain 86-1390, we found a new locus involved in the formation of the lesions. This 753 pb gene, encoding a 27,6 kDa protein was named *paa* (porcine attaching-effacing associated gene). The region containing *paa* is inserted between *yciD* and *yciE* at 28,3 minutes of the *E. coli* K12 chromosome. Paa displays 100% identity with Paa from EHEC strains EDL933 and Sakai, 51,8% with PEB3 from *Campylobacter jejuni* and 48% with AcfC from *Vibrio cholerae*. The protein also contains a sulfate binding domain, this motif being associated with bacterial adherence to host cells. The Paa::PhoA hybrid is mainly associated with the bacterial pellet. The presence of *paa* and *eae* sequences in the porcine O45 strain is highly correlated with the A/E phenotype. Paa contributes to the adherence phenotype and may be a new adhesin.

Key words : *E. coli*, porcine strains, attaching and effacing, *paa* (porcine A/E associated gene), adhesion

## Table des matières

<b>Identification du jury</b> .....	<b>ii</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>iv</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>viii</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>ix</b>
<b>Listes des sigles et abréviations</b> .....	<b>x</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>xiii</b>
<b>SECTION 1: Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Problématique</b> .....	<b>2</b>
<b>Recension de littérature</b> .....	<b>4</b>
1. <i>Escherichia coli</i> .....	4
1.1 <i>Escherichia coli</i> entérotoxigénique (ETEC) .....	4
1.2 <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique (EHEC).....	5
1.3 <i>Escherichia coli</i> entéroaggrégatif (EAEC ou EAggEC) .....	7
1.4 <i>Escherichia coli</i> entéroinvasive (EIEC).....	8
1.5 <i>Escherichia coli</i> à adhérence diffuse (DAEC) .....	8
1.6 <i>Escherichia coli</i> entéropathogénique (EPEC) .....	8
2. Lésions de type attachant/effaçant (AE) .....	9
2.1 <i>L'adhérence localisée (étape 1)</i> .....	10
2.2 <i>Sécrétion de protéines bactériennes (étape 2)</i> .....	10
2.3 <i>Adhérence intime et réarrangements du cytosquelette (étape 3)</i> .....	11
2.3.1 Formation du piédestal.....	11
2.3.2 La transduction de signaux .....	14
2.4 <i>Effets des EPEC sur les fonctions de l'épithélium intestinal</i> .....	14
2.5 <i>Hypothèses sur les mécanismes causant la diarrhée</i> .....	16
3. Îlots de pathogénicité.....	16
3.1 <i>Locus of Enterocyte Effacement (LEE)</i> .....	17
3.1.1 Le régulateur Per.....	20
3.1.2 Le régulateur Ler .....	21
3.1.3 Le régulateur global IHF.....	23
3.1.4 Le régulateur Fis .....	23
3.1.5 Le régulateur Gad X .....	24
3.1.6 Quorum sensing .....	25
3.1.7 Régulation par conditions de culture.....	28
3.2 <i>EspC et îlot de pathogénicité espC</i> .....	28
4. Système de sécrétion de type III .....	29
5. Protéines impliquées dans la formation des lésions.....	34
5.1 <i>Intimine</i> .....	34
5.1.1 Récepteurs de l'intimine.....	35

5.1.2	Tropisme tissulaire et spécificité d'hôte.....	37
5.1.3	Régulation de l'expression de l'intimine.....	38
5.1.4	Types d'intimine.....	38
5.2	<i>EspA</i> .....	38
5.3	<i>EspD</i> .....	41
5.4	<i>EspB</i> .....	42
5.5	Régulation de l'expression de <i>espADB</i> .....	44
5.6	<i>EspF</i> .....	44
5.7	<i>EspG</i> .....	46
5.8	<i>Tir</i> (translocated intimin receptor).....	47
5.9	<i>Map</i> ( <i>orf19</i> ).....	52
5.10	Protéines chaperons.....	52
5.10.1	<i>CesT</i> .....	53
5.10.2	<i>CesD</i> .....	55
6.	Autres facteurs de virulence.....	55
6.1	<i>BipA</i> .....	55
6.2	<i>Etk</i> .....	56
6.3	<i>BFP</i> .....	57
7.	PEPEC O45.....	59
7.1	Les facteurs de virulence.....	59
7.1.1	LEE.....	60
7.1.2	Les <i>Esp</i> et <i>Tir</i> .....	60
7.1.3	L'intimine.....	60
7.1.4	L'adhérence.....	61
7.2	Modèle <i>ex vivo</i> .....	61
8.	<i>Paa</i> .....	62
<b>SECTION II: Méthodologie et résultats.....</b>		<b>64</b>
<b>Article.....</b>		<b>65</b>
<b>Characterization of the novel <i>Paa</i> factor involved in the early steps of the attaching and affacing <i>E. coli</i> mechanism.....</b>		<b>66</b>
Abstract.....	67	
Introduction.....	68	
Results.....	71	
<i>Identification of a transposon mutant deficient in attaching and effacing activity</i> .....	71	
<i>Effect of the <i>Paa</i> mutation and the complementation on the adherence phenotype</i> .....	71	
<i>Sequence analysis of <i>paa</i> and associated loci</i> .....	72	
<i>Localisation of <i>paa</i> on the chromosome</i> .....	73	
<i>Creation of a <i>paa</i> mutant by allelic exchange and complementation</i> .....	74	
<i>Development of A/E lesions in vivo by <i>paa</i> positive and negative PEPEC strains</i> .....	74	
<i>Capacity of anti-<i>Paa</i> antibodies to block adhesion</i> .....	74	
Discussion.....	75	
Experimental procedures.....	78	
<i>Bacterial strains and plasmids</i> .....	78	
<i>TnphoA mutagenesis</i> .....	78	
<i>Cloning and DNA sequencing of <i>phoA</i> fusion regions</i> .....	79	
<i>Cloning and sequencing of <i>paa</i></i> .....	80	
<i>Transcomplementation of the M155 <i>paa</i>::TnphoA mutant</i> .....	80	
<i>Quantification of A/E capacity of the mutants</i> .....	81	
<i>Southern analysis</i> .....	81	
<i>Chromosomal localisation of <i>paa</i> gene</i> .....	82	
<i>Non-polar mutation in <i>paa</i></i> .....	82	
<i>Pulsed field gel electrophoresis</i> .....	83	
<i>Production of anti-<i>Paa</i> antibodies</i> .....	84	

<i>Infection of gnotobiotic piglets</i> .....	84
<i>Statistical analysis</i> .....	85
Acknowledgements .....	86
<b>SECTION III: Discussion</b> .....	<b>94</b>
<b>Discussion</b> .....	<b>95</b>
1. <i>Étude bioinformatique du gène paa et de la protéine</i> .....	96
2. <i>Caractérisation de la région du génome portant paa</i> .....	99
3. <i>Étude de la régulation de l'expression de paa</i> .....	100
4. <i>Création d'une souche mutante isogène pour le gène paa</i> .....	101
<b>Conclusions</b> .....	<b>104</b>
<b>Perspectives</b> .....	<b>105</b>
<i>Rôle dans l'adhésion</i> .....	105
<i>Localisation du gène et de la protéine</i> .....	105
<i>Caractérisation du promoteur</i> .....	105
<i>Distribution du gène</i> .....	106
<i>Cible pour la vaccination</i> .....	106
<b>SECTION IV: Annexes</b> .....	<b>107</b>
<b>Annexe 1 : Expression de Paa</b> .....	<b>108</b>
Matériel et méthodes .....	108
<i>Dosage de la phosphatase alcaline</i> .....	108
Résultats .....	108
<b>Annexe 2</b> .....	<b>110</b>
Les trois stratégies pour l'échange allélique .....	110
Schéma de l'échange allélique .....	110
<b>SECTION V : Bibliographie</b> .....	<b>111</b>



## Liste des tableaux

### SECTION I : Introduction

<i>Tableau I: Protéines du SSTT des EPEC et leurs homologues .....</i>	<i>33</i>
<i>Tableau II: Comparaison des séquences protéiques entre la souche 86-1390 et autre AEEC.....</i>	<i>60</i>
<i>Tableau III: Corrélation entre la présence de eae et paa chez des isolats de E. coli .....</i>	<i>63</i>

### SECTION II: Méthodologie et Résultats

<i>Table I: Integrity of the yciDE region in paa positive strains.....</i>	<i>92</i>
<i>Table II: Clinical and histopathological findings in piglets inoculated with PEPEC O45.....</i>	<i>93</i>

## Liste des figures

### SECTION I: Introduction

<i>Figure 1: Structure du piédestal.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 2: Le LEE de la souche EPEC E2348/69.....</i>	<i>19</i>
<i>Figure 3: Modèle proposé pour la cascade régulatrice du LEE des EPEC.....</i>	<i>25</i>
<i>Figure 4: Système LuxI/LuxR chez Vibrio fischeri.....</i>	<i>26</i>
<i>Figure 5: Modèle proposé de l'assemblage du complexe de l'aiguille.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 6: 190 derniers acides aminés de l'intimine.....</i>	<i>36</i>
<i>Figure 7: Filaments EspA.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 8 : Modèle en épingle à cheveux de la structure de Tir.....</i>	<i>48</i>
<i>Figure 9: Modèle du mécanisme d'action de CesT.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 10: Opéron BFP.....</i>	<i>58</i>

### SECTION II: Méthodologie et Résultats

<i>Figure 1: paa mutant strain M155 shows decreased adherence.....</i>	<i>87</i>
<i>Figure 2: Transmission electron micrographs of the ileal explant cultures.....</i>	<i>85</i>
<i>Figure 3: The nucleotide and deduced amino acid sequences of paa.....</i>	<i>89</i>
<i>Figure 4: Alignment of the deduced amino acid sequences between Paa and its homologs.....</i>	<i>90</i>
<i>Figure 5: Reduction of adherence following treatment with anti-Paa antibodies.....</i>	<i>91</i>

### SECTION IV: Annexes

<i>Figure 11: Effet de la culture en milieu liquide sur la production de phosphatase alcaline.....</i>	<i>109</i>
--	------------

## Listes des sigles et abbréviations

AA	Aggregative adherence
AAF	Aggregative adherence fimbriae
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADP	Adénosine diphosphate
AE	Attaching and effacing : Attachant-effaçant
AEEC	Attaching and effacing <i>E. coli</i>
AI	Autoinducteur
AMP	Adénosine monophosphate
AMPc	AMP cyclique
AP	Alkaline phosphatase
ARN	Acide ribonucléique
ARNr	ARN ribosomal
ARNt	ARN de transfert
ATP	Adénosine triphosphate
BFP	Bundle forming pilus
BPI	Bactericidal/permeability-increasing protein
C	Cytosine
Ca <sup>2+</sup>	Ion calcium
CBD	CesT-binding domain
CesT	Chaperone of <i>E. coli</i> secreted Tir
CFA	Colonization factor antigen
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl <sup>-</sup>	Ion chlore
CNF-1	Cytotoxic necrotizing factor
CT	Cholera toxin
C-terminal	Carboxy-terminal
CTP	Cytosine triphosphate
DA	Diffuse adherence
DAEC	Diffusely adherent <i>E. coli</i>
DART	Domain architecture retrieval tool
DEPEC	Dog EPEC
DHEC	Diarrhea-associated hemolytic <i>E. coli</i>
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAF	EPEC adherence factor plasmid
EaggEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAST	Enteroaggregative heat-stable toxin
EHEC	Enterohaemorrhagic <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> entérohémorragique
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> entéropathogénique
EPS	exopolysaccharides
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>esc</i>	<i>E. coli</i> secretion
Esp	<i>E. coli</i> secreted proteins

ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i> : <i>E. coli</i> entérotoxigénique
<i>etk</i>	<i>E. coli</i> protein tyrosine kinase
FAE	Follicule associated epithelium
FAS	Fluorescence actin staining
Fis	Factor for inversion stimulation
G	Guanine
GFP	Green fluorescent protein
GMP	Guanosine monophosphate
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GTP	Guanosine triphosphate
HC	Hemorrhagic colitis
HEL	Human embryonic lung
H-NS	Histone-like nucleoid structuring protein
HS	Heparan sulfate
HUS	Hemolytic uremic syndrome
IHF	Integration host factor
I <sub>sc</sub>	Short circuit current
IBD	Intimin binding domain
IgSF-like	Superfamille des immunoglobulines
IL-8	Interleukine 8
IS (élément)	Insertion sequence: éléments d'insertion
Km	Kanamycine
LA	Localized adherence : adhérence localisée
LB	Milieu Luria-Bertani
LEE	Locus for enterocyte effacement
Ler	LEE-encoded regulator
LFF	Long fine fimbriae
LM	Light microscopy
LT	Heat-labile toxin
Mn <sup>2+</sup>	Ion manganèse
Map	Mitochondrial associated protein
MLC	Myosin light chain
NaCl	Chlorure de sodium
NCBI	National center for biotechnology information
N-terminal	Amino-terminal
OD	Optic density
Orf	Open reading frame
PAI	Pathogenicity island
PCR	Polymerase chain reaction
PD	Potential difference
PEPEC	Porcine EPEC
Per	Plasmid encoded regulator
PFGE	Pulsed field gel electrophoresis
pI	Point isoélectrique
PI	Phosphatidylinositol
p.i.	Post infection

PKA	Protéine kinase A
<i>pheU</i>	Phénylalanine U
<i>phoA</i>	Phosphatase alcaline
RDEC-1	rabbit diarrhoeoagenic <i>E. coli</i>
REPEC	Rabbit EPEC
<i>selC</i>	Sélénocystéine C
<i>sep</i>	Secretion of <i>E. coli</i> proteins
SLT	Shiga-like toxin
Sm	Streptomycine
SPI	<i>Salmonella</i> pathogenicity island
SRS	Silencer regulatory sequences
SSTT	Système de sécrétion du type III
ST	Heat labile toxin
STEC	Shiga-toxin producing <i>E. coli</i>
Stx	Shiga-like toxin
Tc	Tétracycline
TCP	Toxin coregulated pilus
TEM	Transmission electronic microscopy
TER	Transepithelial electric resistance
TGF $\beta$	Tumor growth factor
TIBA	Tir-intimin binding area
Tir	Translocated intimin receptor
Tn	Transposon
Tn <sub><i>phoA</i></sub>	Dérivé du Tn5 contenant <i>phoA</i> tronqué inséré dans l'élément IS50 de gauche
TNF $\alpha$	Tumor necrosis factor
tRNA	Voir ARNt
VTEC	Verotoxin producing <i>E. coli</i>
XP	5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate
$\alpha$	Alpha
$\lambda$	Lambda
$\Delta$	Delta : délétion génétique
$\delta$	Delta
$\gamma$	Gamma
$\epsilon$	Epsilon

### Unités de mesure

°C	degrés Celcius	nm	nanomètre
h	heure	pb	paire de base
kb	kilobase	$\mu$ g	microgramme
kbp	kilo paires de base	$\mu$ l	microlitre
MDa	Méga Dalton	$\mu$ m	micromètre
min	minute	$\mu$ M	micromolaire
ml	millilitre	w/v	poids/volume
mM	millimolaire		

## Remerciements

Je tiens à remercier sincèrement toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce projet, mais plus particulièrement:

Josée Harel, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, pour m'avoir soutenue par ses idées et son expérience.

John Fairbrother, mon co-directeur, pour son soutien et son aide dans les questions plus "vétérinaires".

Isabelle Batisson, pour m'avoir pris sous son aile à mon arrivée au laboratoire, pour sa patience et son dévouement au projet.

Aux différents membres du laboratoire, actuels et passés, pour avoir fait de ce lieu de travail un endroit agréable et surtout pour toute l'aide que vous m'avez donné.

Aux membres du GREMIP, professeurs, étudiants, assistants de recherche pour votre soutien technique et les connaissances que vous avez partagées avec moi.

Au CRNSG-Stratégique, pour le soutien financier.

À mes parents, pour vos encouragements et votre confiance en moi depuis toujours.

À Martin, pour ton amour, ta présence et ton appui dans les meilleurs moments comme dans les pires.

**SECTION I : Introduction**

## Problématique

*Escherichia coli* fait partie de la flore intestinale des mammifères et des oiseaux (Lacasse, 1995). La plupart des souches retrouvées dans le tractus intestinal sont non-pathogènes, mais certaines souches possédant divers facteurs de virulence causent de la diarrhée. Ces différentes souches peuvent être distinguées en six catégories suivant leur différents mécanismes de pathogénicité : *E. coli* entérotoxigénique (ETEC), *E. coli* entérohémorragique (EHEC), *E. coli* entéroaggrégatif (EAEC ou EaggEC), *E. coli* entéroinvasif (EIEC), *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et *E. coli* entéropathogène (EPEC).

Les souches *E. coli* entéropathogènes et entérohémorragiques causent des lésions de type attachant-effaçant dans l'intestin (Nataro and Kaper, 1998). Ces lésions sont caractérisées par un attachement intime de la bactérie à l'entérocyte, un effacement des microvillosités et la formation d'un piédestal supportant la bactérie adhérente (Moon *et al.*, 1983). La capacité de produire ces lésions n'appartient pas seulement aux EPEC et EHEC. *Citrobacter rodentium* (cause l'hyperplasie du colon chez la souris) et *H. alvei* (cause des diarrhées chez l'humain) possèdent aussi cette capacité. Les EPEC humains servent de modèle pour comprendre le mécanisme de formation des lésions AE mais on retrouve aussi la maladie chez les porcs (causée par PEPEC), chez les chiens (DEPEC) et les lapins (REPEC), les moutons, les chèvres, les chats, les veaux, les singes tamarins (Broes *et al.*, 1988; Cantey and Blake, 1977; Janke *et al.*, 1989; Mansfield *et al.*, 2001; Moxley and Francis, 1986; Nataro and Kaper, 1998; Zhu *et al.*, 1994).

L'infection par les EPEC est expliquée par un modèle en trois étapes (Donnenberg and Kaper, 1992). Premièrement, la bactérie adhère de façon non-intime à l'entérocyte, c'est l'adhérence localisée. Deuxièmement, des protéines bactériennes sont injectées, via un système de sécrétion du type III, directement dans le cytoplasme de l'hôte et elles activent des voies de transduction de signaux chez la cellule-hôte (Frankel *et al.*, 1998; Jarvis *et al.*, 1995). En dernier lieu, la liaison entre l'intimine (encodée par le gène *eae*) et Tir, son récepteur, permet l'attachement intime de la bactérie à la cellule hôte, ainsi que des



réarrangements du cytosquelette menant à l'effacement des microvillosités et de la formation du piédestal (Rosenshine *et al.*, 1996).

Les facteurs nécessaires à la formation des lésions sont encodés par un îlot de pathogénicité chromosomique appelé le «locus of enterocyte effacement» ou LEE (McDaniel *et al.*, 1995).

Les souches *E. coli* O45 *eae* positives isolées de porcs souffrant de diarrhées post-sevrages peuvent causer des lésions attachant-effaçant (Zhu *et al.*, 1994). Des études précédentes ont permis d'identifier le gène *paa* qui serait impliqué dans le processus de formation des lésions AE, puisque certaines souches PEPEC où *paa* est absent ne produisent pas de lésions ou les produisent de façon retardée. De plus, la souche PEPEC 86-1390 perd sa capacité à causer des lésions lors d'infection expérimentale lorsque le gène *paa* est muté (An, 1998).

Paa semble jouer un rôle important dans la virulence des souches O45. Ce projet avait pour but de caractériser ce facteur dans le but de mieux connaître son implication dans la formation des lésions.

## Recension de littérature

### 1. *Escherichia coli*

*Escherichia coli* a été identifiée pour la première fois en 1885 par un pédiatre allemand qui étudiait la flore intestinale chez les enfants. C'est un organisme qui a été examiné sous toutes ses coutures. Il a été longtemps le modèle pour l'étude de la structure cellulaire, la croissance et du métabolisme bactérien. Il est aussi très utilisé comme véhicule pour le clonage de gènes autant procaryotes qu'eucaryotes. *E. coli* est un représentant important de la flore intestinale des humains et des animaux (les mammifères et les oiseaux), c'est pourquoi elle sert d'indicateur de contamination fécale des aliments et de l'eau. C'est en général une bactérie inoffensive mais certains sérotypes (une trentaine sur quelques milliers) sont reconnus comme pathogènes (Donnenberg and Whittam, 2001; Lacasse, 1995). Le génome de la souche non-pathogène K-12 (MG1655) a été séquencé et contient 4,64 millions de paires de bases (Blattner *et al.*, 1997), tandis que ceux des souches 0157:H7 (EDL933 et Sakai) contiennent respectivement 5,97 et 5,5 millions de paires de bases ajoutées (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001).

Trois syndromes cliniques généraux peuvent résulter de l'infection par *E. coli* pathogène : les infections du tractus urinaire, les méningites/septicémies ainsi que les diarrhées. Les six principales classes de souches d'*E. coli* causant la diarrhée peuvent être distinguées par leurs différents mécanismes de pathogénicité :

#### **1.1 *Escherichia coli* entérotoxigénique (ETEC)**

Cette classe est définie par sa capacité à produire au moins une toxine (Heat Stable Toxin: ST, ou Heat Labile Toxin: LT) codée par un plasmide de virulence. Il a été identifié pour la première fois comme une cause de diarrhée chez des porcelets. Le mécanisme de la maladie est connu : la bactérie colonise la surface muqueuse du petit intestin (grâce à des fimbriae), synthétise ses entérotoxines et se sont celles-ci qui causent la maladie. La toxine LT est sensible à la chaleur et comporte une homologie de structure et de fonction avec l'entérotoxine cholérique (CT). Après s'être attachée à la membrane de l'hôte, la toxine est endocytosée et se lie à l'adénylate cyclase, ce qui résulte en une augmentation de l'AMP

cyclique intracellulaire. Une protéine kinase dépendante du niveau d'AMPc est activée, ce qui mène à une sur-phosphorylation des canaux à Cl<sup>-</sup>. Le résultat est une sécrétion de Cl<sup>-</sup> vers l'extérieur de la cellule et une inhibition de l'absorption du NaCl extracellulaire. Le contenu ionique de la lumière de l'intestin provoque un appel d'eau, ce qui entraîne la diarrhée. La toxine ST, de son côté, est résistante à la chaleur. Il y a deux sous-groupes de toxine ST, soit STa (ou ST-I) et STb. STa se lie à son récepteur, la guanylate cyclase C et cause une augmentation du GMP cyclique dans la cellule-hôte ce qui mène (comme LT) à une stimulation de la sécrétion de Cl<sup>-</sup> et à une inhibition de l'absorption de NaCl résultant en une diarrhée chez l'hôte (Nataro and Kaper, 1998). Le sulfatide présent sur la muqueuse du jejunum serait le récepteur de STb (Rousset and Dubreuil, 1999). Contrairement à STa, STb ne semble pas être associé à une élévation intracellulaire de nucléotide cyclique (Peterson and Whipp, 1995). STb serait plutôt impliquée dans l'activation d'une protéine régulatoire liant le GTP. Cette action permet une augmentation de la concentration d'ions calcium intracellulaires (Dreyfus *et al.*, 1993). Les ions Ca<sup>2+</sup> seraient ensuite impliqués dans l'activation d'une protéine kinase calmoduline-dépendante pouvant déclencher l'ouverture de certains canaux ioniques (Fujii *et al.*, 1997).

Les fimbriae qui servent à l'attachement ont aussi un rôle à jouer dans la spécificité du pathogène, par exemple, les souches exprimant le K88 peuvent causer la maladie chez les porcs seulement tandis que les souches exprimant le K99 infectent les veaux, les moutons et les porcs. Certaines ETEC ont aussi d'autres facteurs de colonisation : les CFA (colonization factor antigen) qui sont spécifiques à l'humain. L'invasion des cellules par les ETEC a été rapportée quelques fois lors de tests *in vitro*, mais jamais *in vivo* (Nataro and Kaper, 1998).

### **1.2 *Escherichia coli* entérohémorragique (EHEC)**

Les souches EHEC (sérotypage O157:H7) causent la colite hémorragique (HC) ainsi que le syndrome urémique hémolytique (HUS) et expriment une toxine "Shiga-like" qui est encodée par un bactériophage intégré dans le chromosome bactérien (Tesh, 1998). La plupart des souches EHEC causent des lésions attachant-effaçant (AE) à la surface épithéliale du gros intestin (Tzipori *et al.*, 1989) et possèdent un plasmide de 60MDa

codant pour une entérohémolysine, ainsi que le LEE (locus for enterocyte effacement) aussi retrouvé chez les EPEC (Paton and Paton, 1998). Les souches EHEC du sérotype O157:H7 tolèrent bien les environnements acides (par exemple l'estomac) et ont une dose infectieuse très faible (Donnenberg and Whittam, 2001).

Il semble que la capacité des souches EHEC à engendrer des lésions AE est suffisante pour causer la diarrhée, mais la présence de la toxine "Shiga-like" (SLT ou Stx) serait nécessaire pour entraîner la diarrhée sanglante ou la colite hémorragique. Les deux formes prévalentes de la toxine chez les souches humaines sont Stx1 et Stx2. Ces toxines sont encodées par des phages lysogènes semblables au phage  $\lambda$  (Donnenberg and Whittam, 2001). Les Stx auraient une action cytotoxique sur les cellules épithéliales de l'intestin mais ne causeraient pas l'augmentation de la sécrétion de Cl<sup>-</sup> comme la LT.

Le rôle de l'entérohémolysine dans l'infection n'est pas encore bien défini. La lyse des globules rouges pourrait permettre le relâchement de l'hème et de l'hémoglobine, ce qui stimulerait la croissance des EHEC, puisqu'on sait que celles-ci possèdent un système spécialisé de transport du fer qui leur permettent d'utiliser l'hème ou l'hémoglobine comme source de fer.

Le seul facteur d'adhérence dont le rôle a été démontré dans la colonisation est l'intimine codée par le gène *eae*, et contrairement aux souches EPEC, les souches EHEC ne possèdent pas de BFP (bundle forming pilus); (Donnenberg and Whittam, 2001).

Les souches EHEC sont classées en deux groupes divergents basés sur l'évolution. Les souches du groupe EHEC1 incluent celles des sérotypes O157:H7 et O55:H7. Ces souches possèdent le LEE inséré au niveau du locus *selC* (Donnenberg and Whittam, 2001). Le groupe EHEC2 contient surtout des souches non-O157, mais produisant Stx, comme les souches de sérotypes O111:H8, O111:H-, O26:H11, O26:H- et plusieurs souches non-motiles ou non typables avec les antisérums standards. Les membres de ce groupe possèdent les mêmes principaux facteurs de virulence que O157:H7 soit Stx et LEE, mais l'analyse génétique évolutive indique que les souches de ce groupe sont assez divergentes de O157:H7 pour être considérées comme un groupe différent à part entière. Le locus LEE y est inséré dans le locus *pheU*. Ce groupe inclut aussi certaines souches ne

produisant pas de Stx soit la souche O15:NM (RDEC-1) qui infectent les lapins (Donnenberg and Whittam, 2001).

La nomenclature des EHEC est un peu déroutante. Les souches EHEC font partie d'un plus grand groupe de souches pathogéniques appelées STEC (ou Shiga-toxin producing *E. coli*) qui sont caractérisées par leur capacité à produire des toxines Shiga (qui sont aussi nommées vérotoxines, et les souches qui les produisent sont aussi désignées par l'acronyme VTEC). Les EHEC sont donc un sous-groupe des STEC possédant souvent le LEE et ayant la capacité de causer des lésions attachant-effaçant (Donnenberg and Whittam, 2001).

### **1.3 *Escherichia coli* entéroaggrégatif (EAEC ou EA<sub>g</sub>gEC)**

Les souches de cette classe adhèrent aux cellules HEP-2 (comme les EPEC) par une "adhérence aggrégative" (AA) c'est-à-dire que les bactéries s'agglutinent l'une à l'autre d'une façon très régulière et spécifique, dans une configuration qui rappelle un mur de pierres imbriquées les unes sur les autres (Clarke, 2001). Elles sécrètent une cytotoxine appelée EAST (Enteroaggregative heat-stable toxin) qui induit la sécrétion de fluide et qui a une certaine homologie avec la ST des ETEC (Savarino *et al.*, 1991). La toxine EAST est retrouvée chez environ 40% des souches EAEC et dans une même proportion chez d'autres souches *E. coli* non-pathogènes. Elle est aussi retrouvée chez les souches ETEC du porc. Le mécanisme d'action des souches EAEC est peu connu, on sait toutefois qu'elles stimulent la sécrétion de mucus chez l'hôte. Il est impossible d'affirmer que les EAEC sont invasives puisqu'il y a peu d'évidences cliniques à ce sujet (Nataro *et al.*, 1998).

Les fimbriae AAF I et II (Aggregative adherence fimbriae) contribuerait à l'AA, mais il a été suggéré que d'autres facteurs seraient impliqués, comme par exemple une protéine de la membrane externe (Czeczulin *et al.*, 1997; Nataro *et al.*, 1998). Un modèle d'infection en trois étapes a été proposé : Le stade 1 implique l'adhérence initiale à la muqueuse intestinale, qui est apparemment facilitée par AAF I et II. Le stade 2 comprend une hyperproduction de mucus ce qui amènerait la production d'un épais biofilm de mucus entourant les bactéries. Le stade 3 inclut l'élaboration de cytotoxines qui endommageraient la muqueuse ainsi que la sécrétion intestinale (Nataro *et al.*, 1998).

#### **1.4 *Escherichia coli* entéroinvasive (EIEC)**

Les souches EIEC sont très rapprochées génétiquement et biochimiquement des *Shigella* spp. Leur mécanisme de pathogénicité est aussi très semblable et comprend cinq étapes. Il y a premièrement une pénétration via les cellules épithéliales de l'hôte, qui est suivie par la lyse de la vacuole endocytique englobant la bactérie. Ensuite survient la multiplication bactérienne intracellulaire. Les bactéries se déplacent ensuite dans le cytoplasme pour finalement s'étendre à la cellule épithéliale adjacente. Les gènes nécessaires à l'invasion sont situés, chez *Shigella* spp et chez les souches EIEC, sur un plasmide de 120-140 MDa, nommé pInv. Parmi ces gènes, on retrouve les locus *mxi* et *spa* qui encodent un système de sécrétion du type III nécessaire pour la sécrétion des protéines Ipa qui sont responsables du phénotype invasif (Nataro and Kaper, 1998). Peu de travaux ont été faits pour caractériser les facteurs de virulence de EIEC de façon moléculaire puisque qu'il a été pris pour acquis qu'ils sont identiques à ceux de *Shigella* spp.

#### **1.5 *Escherichia coli* à adhérence diffuse (DAEC)**

Il y a peu de connaissances sur la pathogénicité des souches DAEC. Elles sont aussi connues sous le nom de DHEC (diarrhea-associated hemolytic E. coli) Ces souches possèdent le fimbriae F1845 qui a une homologie avec les membres de la famille des adhésines Dr. Ce fimbriae est encodé par des gènes autant plasmidiques que chromosomiques, et médie une adhérence diffuse (DA). Les souches DAEC ont la capacité d'induire des projections (finger-like projections) qui proviennent de la membrane de cellules Caco-2 ou HEP-2. Ces projections entourent les bactéries (sans que ce soit considéré comme une invasion) et leur donnent une certaine protection contre la gentamycine (Nataro and Kaper, 1998). Les souches DAEC produisent aussi une  $\alpha$ -hémolysine et la toxine CNF-1 (Clarke, 2001).

#### **1.6 *Escherichia coli* entéropathogénique (EPEC)**

Les souches *E. coli* entéropathogéniques, une cause majeure de diarrhée dans les pays en voie de développement (Nataro and Kaper, 1998), colonisent la muqueuse de l'intestin grêle (jejunum) et sont caractérisées par une particularité histopathologique : la

formation de lésions de type attachant/effaçant. De façon générale les souches EPEC sont considérées comme étant incapables d'invasion, mais plusieurs photos publiées ont montré des bactéries intracellulaires dans les cellules épithéliales de l'intestin (Moon *et al.*, 1983; Staley *et al.*, 1969). Deux groupes phylogénétiques ont été identifiés. Le premier groupe EPEC1 inclut les premières souches identifiées, soit la souche modèle des infections humaines E2348/69 (sérotypage O127:H6), et les souches de sérotypes O55:H6, O119:H6, O125:H6, O127:H6, O142:H6. Ces bactéries possèdent généralement le LEE et le plasmide EAF (EPEC adherence factor) et montrent un phénotype d'adhérence localisée typique (Donnenberg and Whittam, 2001). Le groupe EPEC2 contient les sérotypes O111:H2, O114:H2, O126:H2 et O128:H2. La divergence entre les deux groupes n'est pas seulement attribuable à leurs gènes de ménage (housekeeping genes), mais les souches EPEC2 possèdent aussi des allèles distincts pour l'intimine et différents sites d'insertion du LEE (Donnenberg and Whittam, 2001; Frankel *et al.*, 1998).

## **2. Lésions de type attachant/effaçant (AE)**

Les lésions de type attachant-effaçant ont été décrites pour la première fois en 1969 (Staley *et al.*, 1969). Ces lésions sont produites à la suite d'un attachement intime entre la bactérie et la cellule-hôte, de l'effacement (destruction) de la bordure en brosse formée par les microvillosités et de la formation d'un piédestal supportant la bactérie adhérente.

La capacité de produire ces lésions n'appartient pas seulement aux EPEC. *E. coli* entérohémorragique (EHEC), *Citrobacter rodentium* (cause de l'hyperplasie du colon chez la souris) et *Hafnia alvei* (cause de diarrhées chez l'humain) possèdent aussi cette capacité. Les EPEC humains servent de modèle pour comprendre l'infection mais on retrouve aussi ces lésions chez le porc (dues à PEPEC), chez le chien (DEPEC) et le lapin (REPEC), le mouton, la chèvre, le chat, le veau et le singe tamarin (Broes *et al.*, 1988; Cantey and Blake, 1977; Janke *et al.*, 1989; Mansfield *et al.*, 2001; Moxley and Francis, 1986; Nataro and Kaper, 1998; Zhu *et al.*, 1994).

En 1992, Donnenberg et Kaper ont proposé un modèle en trois étapes de l'infection par les EPEC (Donnenberg and Kaper, 1992) :

## 2.1 L'adhérence localisée (étape 1)

En 1979, il a été remarqué que les souches EPEC pouvaient adhérer aux cellules HEp-2 en culture, tandis que la plupart des souches non-EPEC n'avaient aucune capacité d'adhérer à ces mêmes cellules (Cravioto *et al.*, 1979). Les EPEC forment des microcolonies denses à la surface des cellules eucaryotes au lieu de les recouvrir uniformément, ce qui les différencie des autres souches de *E. coli* causant la diarrhée (Nataro and Kaper, 1998). Cette distribution des bactéries est appelée l'adhérence localisée et diffère des patrons d'adhérence des souches EAEC et DAEC (Kaper, 1994). En 1991, Girón a décrit la présence de fimbriae produits par les souches EPEC (Giron *et al.*, 1991). Ces fimbriae inductibles ont été nommés BFP (bundle forming pilus) à cause de leur tendance à s'aggréger. Le BFP est un fimbriae de type IV encodé par le plasmide EAF (EPEC adherence factor). On a cru que ces fimbriae permettaient l'attachement initial entre la bactérie et la cellule-hôte (Donnenberg and Kaper, 1992; Donnenberg *et al.*, 1997a; Giron *et al.*, 1991). Toutefois, les mutants ne possédant pas le plasmide EAF réussissent quand même à s'attacher *in vitro* aux cellules HEp-2 et à causer de lésions AE, mais ne forment plus de microcolonies (Frankel *et al.*, 1998; Hicks *et al.*, 1998). Aussi, une mutation  $\Delta bfpF$ , qui empêche la bactérie de se dissocier des microcolonies, cause beaucoup moins de diarrhée chez des volontaires humains que la souche sauvage (Bieber *et al.*, 1998). Le BFP serait donc plutôt un facteur de virulence impliqué dans la formation de microcolonies et la propagation de l'infection via un détachement des bactéries permettant une colonisation des surfaces muqueuses voisines. L'attachement initial non-intime de la bactérie à la cellule-hôte serait plutôt dû à d'autres facteurs encore non-déterminés (Frankel *et al.*, 1998).

## 2.2 Sécrétion de protéines bactériennes (étape 2)

Suite à la liaison des bactéries EPEC aux cellules épithéliales, il y a une activation de plusieurs signaux chez la cellule-hôte. Comme chez d'autres pathogènes entériques tels *Shigella*, *Yersinia* et *Salmonella*, les bactéries EPEC possèdent un système de sécrétion du type III qui est responsable de l'exportation de facteurs de virulence (Jarvis *et al.*, 1995). Au moins six protéines sécrétées par les EPEC: EspA, EspB, EspD, EspF, Map et Tir sont



nécessaires pour activer les voies de transduction de signal chez la cellule-hôte. Une fois sécrétée, EspA forme une structure filamenteuse à la surface de la bactérie et pourrait servir de canal permettant la livraison de Tir, EspB, EspD, EspF et Map à l'intérieur de la cellule-hôte (Kenny *et al.*, 1997b; Kenny and Jepson, 2000; Wachter *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 1998). Les fonctions de EspB et D ne sont pas bien définies, mais il semblerait que EspB soit transloquée directement dans le cytoplasme de la cellule-hôte et insérée dans la membrane cytoplasmique (Taylor *et al.*, 1998). Tandis que EspD serait impliqué dans la formation du filament de EspA mais n'est pas retrouvé associé au filament (Frankel *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998). Il est ensuite localisé dans la membrane cytoplasmique de l'hôte. EspB et EspD pourraient faire partie de la machinerie de translocation en servant à former des pores dans la membrane de l'hôte (Ide *et al.*, 2001; Knutton *et al.*, 1998). Après l'insertion de Tir dans la membrane cytoplasmique de la cellule-hôte, la protéine est phosphorylée sur un résidu tyrosine (Kenny *et al.*, 1997b) et probablement aussi sur des résidus sérine et thréonine (Kenny, 1999).

### **2.3 Adhérence intime et réarrangements du cytosquelette (étape 3)**

L'attachement intime nécessite la présence de l'intimine qui médie la liaison entre la bactérie et la cellule-hôte grâce à son interaction avec Tir (Rosenshine *et al.*, 1996). Tir est le premier exemple d'un récepteur injecté par la bactérie dans une cellule-hôte (Kenny *et al.*, 1997b). Cette liaison entraîne aussi des réarrangements majeurs dans le cytosquelette, ce qui amène l'effacement des microvillosités de la cellule-hôte et la formation du piédestal supportant la bactérie adhérente (Rosenshine *et al.*, 1996).

#### **2.3.1 Formation du piédestal**

Ces structures peuvent mesurer jusqu'à 10  $\mu\text{m}$  (Rosenshine *et al.*, 1996). L'ultrastructure du piédestal (Figure 1) n'a pas encore été totalement déterminée mais il serait composé de filaments d'actine ainsi que de plusieurs protéines associées à l'actine soit l' $\alpha$ -actinine, fimbrine, taline, ezrine, viline, chaîne légères de myosine, VASP, WASP et le complexe Arp2/3 (Adam *et al.*, 1995; Finlay *et al.*, 1992; Kalman *et al.*, 1999; Sanger *et al.*, 1996). Tir est localisé à l'extrémité du piédestal et c'est l'interaction Tir-Intimine qui

permet la focalisation de l'actine et de toutes les protéines associées (Goosney *et al.*, 2000b). L'ordre de recrutement des différentes protéines commence à être connu. Suite à la liaison entre Tir et l'intimine, WASP est recrutée en premier via son domaine de liaison à la GTPase (GBD: GTPase binding domain) et se localise à l'extrémité du piédestal (Kalman *et al.*, 1999). Ensuite, le domaine C-terminal de WASP recrute le complexe Arp2/3 qui se retrouve sur la longueur du piédestal, laissant supposer qu'il y est incorporé au fur et à mesure que le piédestal s'élabore (Goosney *et al.*, 2000b). Le complexe Arp2/3 permet l'initiation de la nucléation de l'actine et l'embranchement de filaments d'actine (Mullins *et al.*, 1998). Aussi, Tir interagit avec l' $\alpha$ -actinine, mais cette fois, la phosphorylation de la tyrosine n'est pas nécessaire (Goosney *et al.*, 2000a). L'interaction avec l' $\alpha$ -actinine rappelle les complexes d'adhésion focale (focal adhesion). Les complexes d'adhésion focale sont des petites régions à la surface des cellules, qui sont attachées à la matrice extracellulaire. L'attachement est médié par des protéines transmembranaires comme les intégrines qui sont liées via d'autres protéines aux filaments d'actine du cytoplasme (Alberts *et al.*, 1994). L' $\alpha$ -actinine, plastine, taline, ezrine et viline sont retrouvées sur la longueur du piédestal, tandis que la myosine II et la tropomyosine sont retrouvées à la base du piédestal (Adam *et al.*, 1995; Finlay *et al.*, 1992; Sanger *et al.*, 1996).

Une accumulation Tir-indépendante du complexe d'annexine-2/protéine S100A10 sous la bactérie adhérente a aussi été identifiée. EspB et/ou EspD pourraient servir d'ancrage pour ce complexe protéique (Zobiack *et al.*, 2002). L'annexine-2 possède trois sites de liaison au  $\text{Ca}^{2+}$  et interagit avec les phospholipides acides retrouvés du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire ou des membranes des endosomes (Gerke and Moss, 1997). Elle peut aussi lier le cytosquelette d'actine dans une interaction  $\text{Ca}^{2+}$  dépendante (Filipenko and Waisman, 2001). L'annexine-2 existe sous forme monomérique mais est majoritairement retrouvée en complexe hétérotétramérique avec la protéine S100A10 qui se lie au domaine N-terminal de l'annexine (Zobiack *et al.*, 2002). Aussi, on remarque une accumulation de cholestérol et de protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) sous la bactérie adhérente. Ces microdomaines concentrés en cholestérol et protéines associées au GPI sont appelées "rafts". Ceci indique que l'attachement des EPEC induit une agglomération des "rafts" ainsi qu'un recrutement d'annexine-2/S100A10 qui pourrait faire

le lien entre le "raft" et le cytosquelette d'actine, de façon Tir-indépendante (Zobiack *et al.*, 2002).

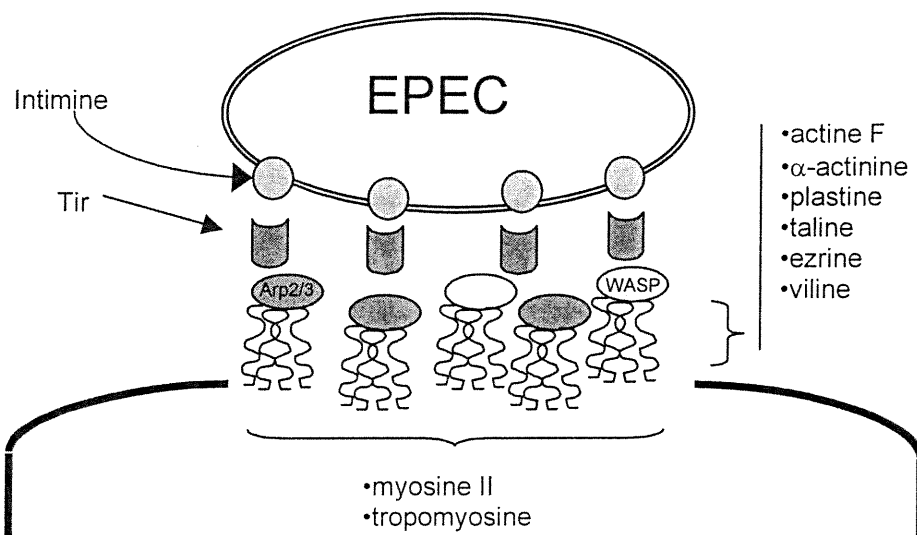


Figure 1 : Structure du piédestal, le complexe Arp2/3 et WASP sont recrutés à l'extrémité du piédestal, tandis que l'actine F,  $\alpha$ -actinine, plastine, taline, ezrine et viline sont retrouvés sur la longueur du piédestal. La myosine II et la tropomyosine sont retrouvés à la base. Adapté de Vallance, B.A. et B.B. Finlay, 2000, PNAS, 97(16) 8799-8806.

La fonction du piédestal n'est pas encore bien connue. Il permet entre autres à la bactérie adhérente de se mouvoir à la surface de la cellule-hôte à une vitesse de 0,03 à 0,07  $\mu\text{m}$  par seconde (Sanger *et al.*, 1996). En plus, le piédestal pourrait permettre à la bactérie d'éviter d'être internalisée par macropinocytose. En utilisant des macrophages murins J774A.1 ou RAW264.7 comme cellules-hôtes, il a été montré que les EPEC ne sont pas internalisées (Goosney *et al.*, 1999). Cette inhibition de l'internalisation nécessite la présence d'un système de sécrétion du type III (SSTT) fonctionnel, de EspA, EspB et EspD et est Tir-indépendante (Celli *et al.*, 2001; Goosney *et al.*, 1999). Les EPEC empêchent la polymérisation de l'actine F au site de contact bactérien en bloquant l'activité d'une phosphatidylinositol (PI) 3-kinase. Ce blocage est médié par des effecteurs sécrétés par le

SSTT (Celli *et al.*, 2001). La PI-3-kinase régule l'extension des pseudopodes menant à la phagocytose (Araki *et al.*, 1996).

### 2.3.2 La transduction de signaux

Les protéines sécrétées par les EPEC induisent des événements de transduction de signal dans la cellule-hôte, dont l'activation de la protéine kinase C, de la phospholipase C- $\gamma$ , de la voie des kinases MEK/ERK, des kinases p38 et Jun (Crane and Oh, 1997; Czerucka *et al.*, 2001; de Grado *et al.*, 2001; Kenny and Finlay, 1997). L'activation des kinases nécessite un SSTT fonctionnel (Czerucka *et al.*, 2001). L'activation de la voie des kinases MEK/ERK mène à une augmentation de l'expression de *egr-1*. Ce gène encode un facteur de transcription qui peut réguler l'expression de plusieurs gènes soit ceux encodant le TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , "intracellular adhesion molecule 1", CD44, "macrophage colony-stimulating factor", metalloprotéinases, etc. (de Grado *et al.*, 2001). Sous la lésion, plusieurs protéines du cytosquelette de l'hôte s'accumulent, plusieurs d'entre elles sont phosphorylées après l'infection. C'est la chaîne légère de myosine de 20kDa (MLC<sub>20</sub>) qui est la protéine la plus phosphorylée. En plus de contrôler les contractions des muscles lisses, la phosphorylation des MLC<sub>20</sub> régule plusieurs mécanismes non-musculaires incluant la perméabilité des jonctions serrées (tight junctions). La jonction serrée relie les cellules épithéliales adjacentes et gouverne le passage de l'eau, de différentes molécules ainsi que des cellules du système immunitaire. Plusieurs protéines font partie de la jonction serrée dont ZO-1, ZO-2, ZO-3, occludine, claudine, cinguline, etc. L'infection par les EPEC induit une augmentation de la phosphorylation de tyrosines chez l'eitrine, correspondant à sa redistribution vers le piédestal (Simonovic *et al.*, 2001).

## **2.4 Effets des EPEC sur les fonctions de l'épithélium intestinal**

L'épithélium intestinal a trois fonctions majeures: le transport d'ions, la fonction de barrière (jonctions serrées) et la surveillance et réponse immunitaire au contenu de la lumière de l'intestin (Hecht, 2001).

Les effets des EPEC sur le transport d'ions sont un peu confus. L'infection de cellules Caco-2 (épithélium intestinal humain) avec la souche EPEC 2348/69 stimule une

augmentation rapide du courant  $I_{sc}$  qui représente l'activité nette du transport d'ions. Une portion de cette réponse serait due à la sécrétion d'ions  $Cl^-$  (Collington *et al.*, 1998b). Cependant, une autre équipe travaillant avec les cellules T84 (épithélium intestinal humain) n'a observé aucune augmentation de l' $I_{sc}$  (Hecht and Koutsouris, 1999). Ces résultats pourraient être expliqués par le fait que les cellules Caco-2 sont retrouvées dans les villosités tandis que les T84 sont des cellules sécrétoires des cryptes. Des études *in vivo*, pourront faire la lumière sur ce point (Hecht, 2001).

L'infection par les EPEC influence aussi les jonctions serrées. Une diminution de la résistance électrique transépithéliale (TER) a été remarquée chez les cellules en monocouches (autant chez les cellules Caco-2 que chez les T84), ce qui indique une augmentation de la perméabilité des tissus (Canil *et al.*, 1993; Spitz *et al.*, 1995). Les EPEC pourraient perturber les jonctions serrées par plusieurs mécanismes. L'infection par les EPEC stimule la phosphorylation des chaînes légères de myosine ( $MLC_{20}$ ); (Manjarrez-Hernandez *et al.*, 1996). Ces dernières, une fois phosphorylées, médient la contraction du cytosquelette associé aux jonctions, d'où une perturbation des jonctions serrées (Yuhan *et al.*, 1997). Aussi, l'observation de monocouches de cellules épithéliales intestinales infectées par les EPEC a montré la présence d'une perturbation progressive de l'état de phosphorylation et de la distribution de l'occludine, une protéine transmembranaire associée aux jonctions serrées. Suite à l'infection, l'occludine se dissocie de la jonction serrée et est redistribuée dans le cytoplasme. Cette redistribution est associée avec une baisse drastique de la TER (Simonovic *et al.*, 2000). Il y aurait un lien entre la concentration d'EspF dans la cellule-hôte, la localisation de l'occludine et la perturbation des jonctions serrées (McNamara *et al.*, 2001). Les EPEC auraient aussi un impact sur une autre protéine associée aux jonctions serrées, la protéine ZO-1, mais des études supplémentaires seront nécessaires (Hecht, 2001).

En riposte aux infections bactériennes, l'épithélium intestinal déclenche une réponse inflammatoire (Hecht, 2001). Le contact entre les EPEC et les cellules épithéliales intestinales, indépendamment des LPS, est suffisant pour initier le recrutement de neutrophiles (Savkovic *et al.*, 1996, 1997). Pour ce faire, les EPEC activent le facteur de transcription NF- $\kappa$ B entraînant une production d'IL-8, ce qui permet la mobilisation des

neutrophiles (Savkovic *et al.*, 1997). La protéine MIP-2 $\alpha$  est aussi impliquée dans le recrutement des neutrophiles (de Grado *et al.*, 2001).

### **2.5 Hypothèses sur les mécanismes causant la diarrhée**

Malgré tout ce qui est connu de la pathogène des EPEC, les mécanismes par lesquels ils causent la diarrhée ne sont pas encore totalement expliqués. L'effacement des microvillosités pourrait mener à une perte de surface d'absorption. Cet effacement n'est toutefois pas généralisé à tout l'intestin puisqu'il n'atteint que les zones où les bactéries sont attachées (Knutton *et al.*, 1987). L'activation de la protéine kinase C pourrait contribuer à l'activation de la sécrétion d'ions Cl<sup>-</sup> via le CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator); (Crane and Oh, 1997). La perturbation de l'intégrité des jonctions serrées amène une augmentation de la perméabilité cellulaire ainsi qu'une facilitation de la migration des neutrophiles (Collington *et al.*, 1998b). Les neutrophiles peuvent activer le récepteur d'adénosine à la surface des cellules épithéliales intestinales et mener à une sécrétion de Cl<sup>-</sup>. L'induction de la diarrhée est souvent très rapide puisqu'elle peut apparaître aussi tôt que 4h post-ingestion chez les volontaires humains (Donnenberg *et al.*, 1993a). La diarrhée apparaîtrait donc hâtivement, suivant un effet rapide consécutif à la sécrétion d'ions (Cl<sup>-</sup> ou HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>), puis, les changements du cytosquelette et l'apparition des neutrophiles contribueraient à la persistance de la maladie (Goosney *et al.*, 2000b).

### **3. Îlots de pathogénicité**

Les îlots de pathogénicité (PAI: pathogenicity island) sont des régions d'ADN, souvent instables, qui sont retrouvées chez les bactéries pathogènes, mais absentes chez leurs homologues non-pathogènes. Ils contiennent un ou plusieurs gènes de virulence, comme des gènes encodant des adhésines, des toxines, des invasines, des systèmes de sécrétion, d'acquisition du fer, de synthèse d'antigène O ou de capsule, des effecteurs d'apoptose, etc. La majorité des PAIs ont une taille entre 10 et 200 kb, mais certaines souches possèdent aussi de plus petites régions d'ADN encodant des facteurs de virulence. Ces petites régions ont été nommées "pathogenicity islets". L'ADN des PAI est souvent composé d'un contenu en G+C différent de celui du reste du génome, ce qui laisse croire

que l'obtention d'un PAI se fait par transfert horizontal. Environ 75% des PAI connus à ce jour sont associés avec des gènes d'ARN de transfert (ARNt), car ces derniers servent souvent de sites d'intégration de séquences d'ADN étranger. Les PAI sont souvent flanqués de séquences répétées directes, qui résulteraient de l'intégration dans le génome via la recombinaison avec des bactériophages ou des plasmides. Les PAI contiennent souvent des gènes, soit fonctionnels ou cryptiques, encodant des facteurs de mobilité comme des intégrases, des transposases et des éléments IS. La régulation des facteurs de virulence encodés par un PAI se fait souvent via un régulateur dont le gène est retrouvé sur le même îlot.

Les premiers îlots de pathogénicité ont été observés chez des pathogènes humains de la famille des *enterobacteriaceae*, mais il est maintenant clair que ces îlots sont aussi retrouvés chez les pathogènes des plantes et des animaux (Hacker and Kaper, 2000).

### 3.1 Locus of Enterocyte Effacement (LEE)

Les gènes nécessaires pour la formation de lésions AE sont retrouvés dans un îlot de pathogénicité de 35 624 pb pour les EPEC (O127:H6) et de 43 359 pb pour les EHEC (O157:H7, souche EDL933) : le "locus of enterocyte effacement" ou LEE. Celui-ci a été décrit premièrement chez EPEC E2348/69 (O127:H6); (McDaniel *et al.*, 1995) mais est aussi retrouvé chez tous les pathogènes qui produisent les lésions AE : EHEC, RDEC-1, *H. alvei*, *C. rodentium* ainsi que chez d'autres AEEC pathogènes pour une variété d'animaux (McDaniel *et al.*, 1995). La proportion en G+C du LEE de la souche O127:H6 est de 38,36% (Elliott *et al.*, 1998), ce qui diffère significativement du reste du chromosome de *E. coli* K-12 (50,8%); (Blattner *et al.*, 1997). On peut donc penser qu'un transfert horizontal (à partir d'une autre espèce) aurait permis l'obtention du LEE par les EPEC et autres pathogènes.

Le LEE de EPEC E2348/69 contient 41 cadres de lecture ouverts (orfs) prédits et arrangés en au moins cinq opérons (Figure 2); (Elliott *et al.*, 1998). Ceux-ci sont structurés en trois régions fonctionnelles. La première inclut un système de sécrétion de type III (Jarvis *et al.*, 1995), la deuxième contient les gènes *eae* et *tir*, la troisième et dernière région

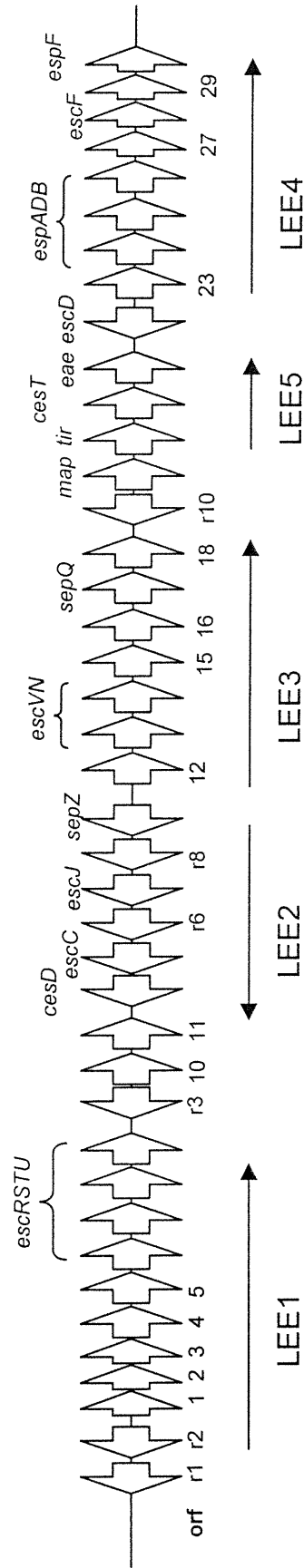
comprend les gènes *esp* qui codent pour les protéines Esp (*E. coli* secreted proteins). Le LEE est organisé en cinq opérons, les trois premiers (LEE1 à LEE3) codent pour les protéines composant le système de sécrétion de type III, LEE4 code pour les protéines sécrétées (EspA, EspB et EspD); (Mellies *et al.*, 1999) tandis que le LEE5 contient les gènes *tir*, *cesT* et *eae* (Donnenberg *et al.*, 1997b; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001). Il est intéressant de noter la présence, dans les régions promotrices du LEE2 et du LEE3, de deux séquences régulatrices "silencers" (Silencer Regulatory Sequences ou SRS); (Bustamante *et al.*, 2001).

Le clonage du LEE<sub>EPEC</sub> dans une souche K-12, contenant le plasmide EAF, confère à cette dernière la capacité à causer des lésions AE typiques. Donc, ce LEE est suffisant pour entraîner le phénotype AE (McDaniel and Kaper, 1997).

Chez la souche EPEC E2348/69, le LEE est inséré à 82 minutes du chromosome de *E. coli* K-12, de façon adjacente au locus *selC* (McDaniel *et al.*, 1995). Le locus *selC* qui code pour un ARN de transfert (sélénocystéine) semble un site privilégié pour les recombinaisons puisqu'il sert aussi de site d'intégration pour le phage phiR73, et PAI-1, un îlot de pathogénicité retrouvé chez *E. coli* uropathogène (Perna *et al.*, 1998). Un second site d'insertion du LEE a été démontré récemment, chez EHEC O26:H- à 94 minutes du chromosome au locus *pheU* (Wieler *et al.*, 1997). De plus, il a été démontré en utilisant une souche de sérotype O111ab:H25 que le LEE n'est situé ni dans *selC*, ni dans *pheU*, suggérant un troisième site d'insertion du LEE (Sperandio *et al.*, 1998). On pourrait donc penser que LEE s'est inséré à plusieurs reprises pendant l'évolution de la lignée pathogène EPEC/EHEC. Il y aurait au moins trois événements d'insertion donc trois groupes différents.



Fig 2: Le LEE (locus of enterocyte effacement) de la souche EPEC E2348/69, adapté à partir de Elliott, S.J. *et al.* Mol Microbiol. 1998, 28(1) p.1-4.



La séquence complète du LEE de EHEC O157:H7 souche EDL933 a aussi été déterminée (Perna *et al.*, 1998). Cette fois, l'îlot de pathogénicité a une taille de 43,4 kb. La grande différence de taille avec le LEE<sub>EPEC</sub> est attribuée à la présence du prophage cryptique 933L faisant partie de la famille P4, qui a une taille de 7,5 kb et qui est situé à l'extrémité *selC* du locus. Il est peu probable que le LEE ait été mobilisé par ce prophage puisque les deux sites *att* possibles se retrouvent du même côté du LEE (Perna *et al.*, 1998). Cinquante-quatre orfs ont été identifiés dont 13 font partie du prophage et 41 correspondent à ceux déjà décrits pour les souches EPEC, ces derniers sont situés dans le même ordre que pour le LEE<sub>EPEC</sub>. Le contenu en G+C du LEE<sub>EHEC</sub> est de 40,9% (dont 51,7% pour le prophage et 39,6% pour le reste du LEE). La séquence nucléotidique est à 93,9% identique à celle du LEE de la souche EPEC E2348/69. Aussi, les gènes encodant le système de sécrétion du type III sont très conservés, tandis que les autres gènes sont plus variables. Par exemple, pour *tir*, l'identité n'est que de 66,5%. En général, les gènes les moins conservés sont ceux codants pour des protéines qui interagissent avec la cellule-hôte (EspB, EspA, EspD, intimine et Tir), ce qui laisse croire qu'ils sont soumis à la sélection naturelle pour échapper au système immunitaire de l'hôte (Perna *et al.*, 1998). Contrairement au LEE<sub>EPEC</sub>, le LEE<sub>EHEC</sub> n'est pas capable d'induire le phénotype AE chez une souche K12 (Elliott *et al.*, 1999b).

### 3.1.1 Le régulateur Per

Per (Plasmid encoded regulator) est un régulateur global qui affecte la transcription autant de gènes chromosomiques que plasmidiques. Le locus Per, situé sur le plasmide EAF des EPEC, est composé de quatre gènes : *perA*, *perB*, *perC* et *perD* (Gomez-Duarte and Kaper, 1995). PerA montre une similarité de séquence avec des activateurs transcriptionnels de gènes de virulence comme *virF* de *Shigella* et aussi avec des membres de la famille de régulateurs AraC. PerB montre quelques similarités avec des protéines eucaryotes servant à la liaison à l'ADN, tandis que du côté de PerC et PerD, on ne dénote aucune homologie avec des protéines connues. On peut cependant souligner qu'une identité de plus de 70% a été remarquée entre la séquence nucléotidique de *perD* et des éléments transposables comme Tn7 et IS630, ce qui suggère que la région *per* ait été introduite chez

les EPEC par un événement de transposition. PerB et PerC sont des protéines qui amélioreraient l'activité de PerA, par un mécanisme encore inconnu (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Tobe *et al.*, 1996).

Per active les promoteur de *bfpA* et de *perA*, il régule donc sa propre synthèse et celle du BFP (Bustamante *et al.*, 1998; Martinez-Laguna *et al.*, 1999; Munson *et al.*, 2001; Tobe *et al.*, 1996). Il est aussi impliqué dans la modulation de l'expression de *eae*, dont la régulation à la baisse de l'expression de *eae* après la formation des lésions, dans l'activation de la sécrétion protéique via entre autres les gènes *escR* et *escJ* qui sont des composants du système de sécrétion du type III (Frankel *et al.*, 1998; Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Kenny *et al.*, 1997a; Knutton *et al.*, 1997). Per active aussi la transcription du gène chromosomique *trcA* ainsi que celle de l'opéron LEE1 encodant *ler* (Mellies *et al.*, 1999; Tobe *et al.*, 1999).

Un mutant  $\Delta perA$  est moins virulent que la souche sauvage chez des volontaires (Bieber *et al.*, 1998). L'analyse de l'opéron *per* chez 15 souches EPEC a démontré que ces régions sont très conservées. La variation est surtout retrouvée dans les deux tiers en 5' du gène *perA*. Mais, la portion C-terminale de la protéine, contenant le motif hélice-tour-hélice liant l'ADN, est conservée à 100% (Okeke *et al.*, 2001). On ne retrouve pas de locus *per* chez les EHEC (sauf une souche non O157:H7), EIEC, ETEC, EAEC, REPEC, UPEC et *E. coli* de la flore normale. Chez 78 souches EPEC possédant le gène *eae*, 70 sont aussi positives pour *per* (Gomez-Duarte and Kaper, 1995).

### 3.1.2 Le régulateur Ler

Récemment, un nouvel activateur de transcription a été identifié, c'est le Ler (LEE-encoded regulator); (Mellies *et al.*, 1999). Celui-ci est le premier gène encodé par l'opéron LEE1 et agit de façon positive et directe sur la transcription des opérons LEE2, 3, 4 et 5 (Figure 3); (Mellies *et al.*, 1999; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001). Cette découverte a permis de décrire pour la première fois une cascade de régulation qui affecte les gènes de virulence des EPEC. Ler est une protéine de 14 kDa et a une homologie de séquence avec H-NS, la similarité étant la plus grande dans la région C-terminale où l'on retrouve le domaine de liaison à l'ADN des protéines de la famille H-NS. Malgré leur similarité, Ler

est fonctionnellement distincte de H-NS puisque les protéines ne peuvent pas être interchangeables et conserver leur activité (Elliott *et al.*, 2000). Alors que Per est trouvé seulement chez les EPEC, Ler est aussi retrouvé chez les EHEC.

Ler est nécessaire chez les EPEC et les EHEC pour former des lésions AE chez des cellules HEP-2, pour la production de EspB, EspA, EspD, EspF, Tir ainsi que des protéines formant l'appareil de sécrétion de type III. De plus, les niveaux d'intimine sont réduits en l'absence de Ler (Elliott *et al.*, 2000; Friedberg *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999). D'autres gènes du LEE qui ne sont pas nécessaires pour la formation des lésions, voient aussi leur transcription augmentée par Ler, soit *rorf2*, *orf10*, *orf19* et *escD*. À cause de la structure en opéron du LEE, on peut prédire que la transcription de *rorf1*, *orf11* et *orf27* serait aussi influencée (Elliott *et al.*, 2000).

Le mécanisme d'action de Ler n'est pas encore connu, mais Ler servirait entre autres à empêcher l'effet répresseur de H-NS sur les opérons LEE2 et LEE3 via leurs séquences régulatrices "silencer" respectives. De fait, en absence de H-NS, les opérons LEE2 et LEE3 sont exprimés constitutivement, tandis qu'en présence de H-NS seul, les opérons sont régulés négativement, et en présence à la fois de H-NS et de Ler, LEE2 et LEE3 sont exprimés. Quelques hypothèses sur ce mécanisme ont été avancées : Ler pourrait compétitionner avec H-NS pour les sites de liaison à l'ADN et/ou altérer la topologie de l'ADN pour empêcher la liaison de H-NS à l'ADN, prévenant ainsi la formation d'un complexe nucléo-protéique qui interdirait l'interaction de l'ARN polymérase avec le promoteur. Ler pourrait aussi empêcher la répression médiée par H-NS en séquestrant cette dernière et en évitant ainsi son interaction avec les SRS (Bustamante *et al.*, 2001). Ler active aussi LEE5 (Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001). Ler affecte également l'expression de gènes situés hors du LEE, dont *espC* chez les EPEC et les EHEC encodant un autotransporteur de 110 kDa ainsi que *tagA* encodant une protéine qui n'a pas encore de fonction connue mais qui fait aussi partie d'un régulon de virulence chez *Vibrio cholerae* (Harkey *et al.*, 1995; Karaolis *et al.*, 1998).

Chez les EHEC, Ler ne semble pas influencer la production de shiga-toxine, ni celle de l'entérohémolysine. Ler régule aussi l'expression de fimbriae et le phénotype d'adhérence puisque chez les EHEC, une mutation dans le gène *ler* est associée avec une

augmentation de l'adhérence à des monocouches de tissus en culture, une modification des patrons d'adhérence ainsi que l'expression de longs fimbriae fins (LFF) qui pourraient médier l'adhérence diffuse (DA) et aggrégative (AA) retrouvée chez le mutant  $\Delta ler$ . Chez les EPEC, un mutant  $\Delta ler$  montrait un mélange d'adhérence localisée (LA), diffuse (DA), aggrégative (AA) à des cellules HEp-2 et exprime des fimbriae non observés chez la souche sauvage. Ces fimbriae ne sont pas des BFP et pourraient être identiques à ceux retrouvés chez la souche EHEC  $\Delta ler$  (Elliott *et al.*, 2000).

### 3.1.3 Le régulateur global IHF

En construisant des fusions transcriptionnelles entre le gène de la GFP (green fluorescent protein) et différents gènes du LEE, il a été démontré que le facteur IHF (integration host factor) active directement *ler* et *rorf2* (*espG*). La fonction de *rorf2* est encore inconnue, mais le gène code pour une protéine putative qui est homologue à VirA de *Shigella* qui est impliquée dans l'invasion et la dissémination intercellulaire (Uchiya *et al.*, 1995). La majorité des autres gènes du LEE sont activés par Ler qui dépend de l'activation par IHF. Ceci implique une activation indirecte de la part du IHF (Friedberg *et al.*, 1999). Il a été suggéré que IHF serait "l'interrupteur principal" pour l'expression des gènes du LEE puisque qu'il active directement le LEE1, et qu'ensuite Ler (encodé par LEE1) serait responsable directement ou indirectement de l'activation des autres gènes incluant les opérons LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5 (Friedberg *et al.*, 1999). IHF est déjà connu comme étant un régulateur de plusieurs mécanismes, incluant la recombinaison site-spécifique, la réplication de l'ADN, la transposition et la régulation positive ou négative de l'expression des gènes (Friedman, 1988; Goosen and van de Putte, 1995).

### 3.1.4 Le régulateur Fis

Fis (Factor for inversion stimulation) fait partie de la famille des protéines associées au nucléoïde ou "histone-like" parce qu'elle a la capacité d'altérer la topologie de l'ADN (Gille *et al.*, 1991; Thompson and Landy, 1988). C'est un régulateur transcriptionnel associé aux gènes du métabolisme primaire comme les enzymes de biosynthèse, les ARN et les ARNr (Gonzalez-Gil *et al.*, 1996). Il semble que Fis soit importante pour assurer la

présence des ressources cellulaires adéquates pour la bactérie entrant en phase exponentielle après une période de latence (Ball *et al.*, 1992). Fis agit sous forme homodimérique en se liant et en courbant une séquence promotrice contenant une séquence consensus GNtYAAWWWtTRaNC (Pan *et al.*, 1996). Aussi, Fis réagit avec le domaine C-terminal de la sous-unité  $\alpha$  de l'ARN polymérase (Bokal *et al.*, 1997).

Un mutant  $\Delta fis$  de la souche E2348/69 forme des microcolonies typiques à la surface de cellules HEp-2 infectées, mais il n'y a pas d'induction de lésions AE. Le mutant produit bien Tir et l'intimine, mais semble incapable d'exprimer les protéines EspABD, Ler et SepL. Il semble donc que la régulation de Fis permette la coordination entre l'expression de certains gènes et le statut nutritionnel ou physiologique de la bactérie (Goldberg *et al.*, 2001).

### 3.1.5 Le régulateur Gad X

Le régulon Per est aussi contrôlé par la protéine GadX qui régule également la transcription de deux gènes (*gadA* et *gadB*) impliqués dans la résistance à l'acide chez *E. coli*. Ces deux gènes font partie du système GAD qui encode deux glutamate décarboxylases (*gadAB*) très homologues entre elles et un antiporteur glutamate:GABA (*gadC*); (De Biase *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 1992). GadX est une protéine de 31,3 kDa qui partage 93,4% d'identité avec son homologue chez K12. GadX possède aussi le double motif hélice-tour-hélice caractéristique des membres de la famille des régulateurs AraC/XylR (Gallegos *et al.*, 1997). De façon intéressante, GadX régule négativement l'expression de *perA* dans des conditions acides, mais régule positivement la transcription de *perA* lorsque les conditions sont basiques. De façon contraire, elle régule positivement le système GAD en conditions acides, mais négativement en conditions basiques. De plus, en milieu minimal additionné de glucose, GadA est un régulateur positif de la transcription de *gadA* et *gadB*. Cette régulation dépendante des changements environnementaux résultant du passage de la bactérie de l'estomac à l'intestin grêle, permettrait aux EPEC d'éviter la synthèse inutile de protéines selon l'endroit où ils se trouvent dans le système digestif de l'hôte (Shin *et al.*, 2001).

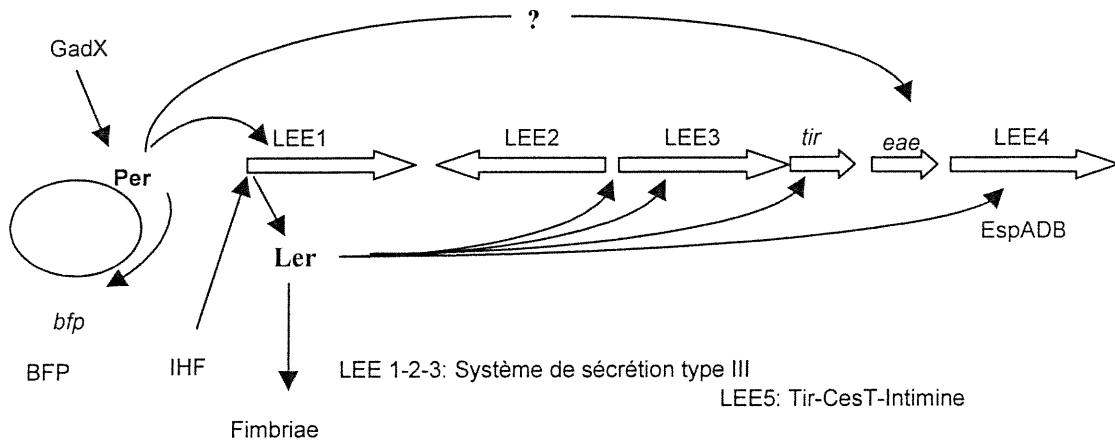


Figure 3 : Modèle proposé pour la cascade régulatrice du LEE des EPEC

### 3.1.6 Quorum sensing

L'effet de quorum ou "quorum sensing" est un mécanisme de transfert de signal entre les cellules via la production de molécules autoinductrices qui permettent à la bactérie de "sentir" sa propre population ainsi que les populations d'autres bactéries environnantes (Sperandio *et al.*, 1999). Cet effet a été décrit pour la première fois en 1970 chez *Vibrio fischeri* et est maintenant retrouvé comme mécanisme de régulation d'expression des gènes chez les bactéries Gram négatif et positif (Nealson *et al.*, 1970). Brièvement, la bactérie produit un autoinducteur qui s'accumule dans le milieu de culture. Quand les molécules autoinductrices atteignent une certaine concentration, elles peuvent lier et activer une protéine régulatrice bactérienne, par exemple *LuxR* chez *V. fischeri*. *LuxR* et ses homologues influencent ensuite la transcription de certains gènes, comme l'opéron *lux* chez *V. fischeri* (Figure 4); (Kanamaru *et al.*, 2000).

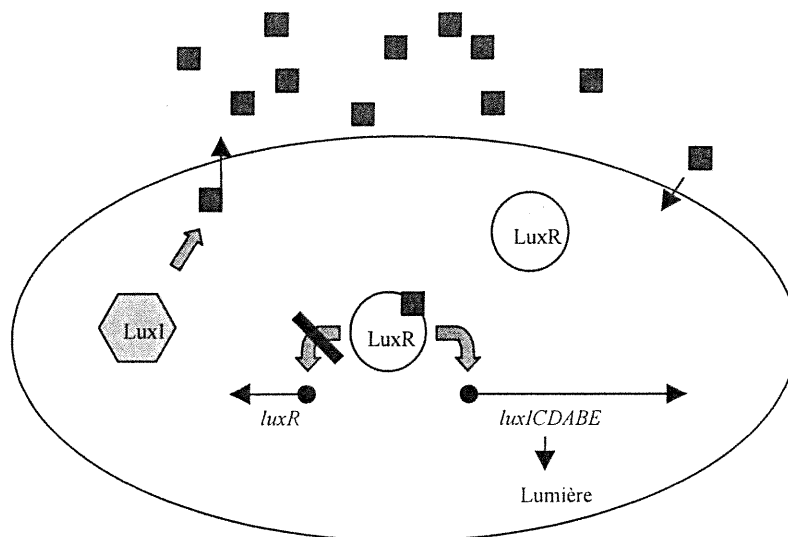


Figure 4 : Système LuxI/LuxR chez *Vibrio fischeri*, adapté de Miller M.B. et B.L. Bassler, Annu Rev Microbiol, 55, p.165-199.

L'autoinducteur synthétisé par *E. coli* n'est pas bien connu. Il a pourtant été démontré que les souches *E. coli* MG1655 et O157:H7, *Salmonella typhimurium* 14028 et LT2 produisent une molécule similaire ou identique au deuxième (AI-2) autoinducteur de *Vibrio harveyi*, chez qui deux systèmes de quorum sensing cohabitent en parallèle (Surette *et al.*, 1999). Il a été déterminé qu'il s'agit d'une petite molécule polaire et qui est résistante à un traitement à 80°C. La molécule est sécrétée de façon maximale en phase mid-exponentielle et est dégradée quand la bactérie entre en phase stationnaire (Surette and Bassler, 1998). Le gène *luxS* est impliqué dans la synthèse de l'autoinducteur chez *E. coli* et *Salmonella*, il encoderait une protéine catalysant une étape enzymatique dans la biosynthèse de l'inducteur homologue à AI-2 de *V. harveyi* (Surette *et al.*, 1999). Les protéines LuxS sont très similaires chez *V. harveyi*, *E. coli*, et *Salmonella*, et des études de complémentation ont montré que les protéines sont interchangeable entre les différentes espèces. L'incapacité à isoler une molécule de type homosérine lactone, laisse croire que les autoinducteurs retrouvés chez ces souches ne seraient pas des molécules d'homosérine lactone, contrairement à d'autres systèmes de quorum sensing, notamment le premier système de *V. harveyi* (Surette *et al.*, 1999).

De façon intéressante, la régulation de la production de l'autoinducteur est différente entre les souches pathogènes et non pathogènes. Par exemple, *E. coli* O157:H7 produit son autoinducteur à 30°C ou 37°C, en présence ou absence de glucose, tandis que *E. coli* K-12



ne le produit qu'en présence certaines sources de carbone. De plus, les souches *E. coli* O157:H7 testées produisent plus d'autoinducteur que les souches *E. coli* non-pathogènes (Surette *et al.*, 1999).

La majorité des gènes encodés par le LEE seraient soumis à une régulation par le "quorum sensing". Les gènes des opérons LEE1, LEE2, ainsi que *tir* et *eae* des souches EPEC et EHEC sont activés directement par quorum sensing. Le régulateur Per (retrouvé chez les EPEC seulement) serait aussi activé par quorum sensing, mais de façon plutôt indirecte (Sperandio *et al.*, 1999).

Récemment, un homologue du régulateur LuxR, nommé SdiA a été identifié comme étant un régulateur négatif de l'expression des gènes *espD* et *eae* chez *E. coli* O157:H7. Aussi, des facteurs extracellulaires retrouvés dans le milieu de culture de O157:H7 peuvent se lier, *in vitro* et *in vivo*, à la portion N-terminale de SdiA (Kanamaru *et al.*, 2000). SdiA est une protéine cytoplasmique possédant un domaine de liaison à l'ADN, a été initialement identifiée il y a une dizaine d'années chez *E. coli* K-12 comme un activateur transcriptionnel de l'opéron *ftsQAZ*, encodant des protéines essentielles pour la division cellulaire (Aldea *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1991). SdiA est aussi retrouvé comme un homologue de LuxR chez *Salmonella enterica* (Ahmer *et al.*, 1998; Michael *et al.*, 2001).

Le système de quorum sensing incluant LuxR semble différent de celui impliquant LuxS. Il y aurait donc deux systèmes chez O157:H7 qui contrôleraient l'expression des facteurs de virulence lors de deux différents stades de la croissance, puisqu'en phase mid-exponentielle, le deuxième système de quorum sensing active les gènes du SSTT, puis quand les cellules atteignent la phase stationnaire, l'autoinducteur 2 est dégradé mais les analogues de l'autoinducteur 1 (système impliquant SdiA) s'accumulent dans le milieu de culture, prêts à réprimer l'expression de plusieurs gènes de virulence dont *espD* et *eae* (Kanamaru *et al.*, 2000).

L'identification de gènes régulés par la densité de la population bactérienne peut sembler étonnante chez EHEC O157:H7 puisqu'une dose infectieuse exceptionnellement faible peut provoquer la maladie (moins de 50 organismes peuvent suffire à causer un épisode). La faible dose infectieuse nécessaire pourrait être expliquée par une activation *in*

*vivo* du système de sécrétion du type III des EHEC via la présence d'autoinducteurs synthétisés par la flore normale de *E. coli* dans l'intestin (Sperandio *et al.*, 1999).

### 3.1.7 Régulation par conditions de culture

Les opérons LEE2 et LEE3 sont régulés négativement à des températures plus hautes que 40°C ou plus basses que 25°C, en présence d'ammonium ou en milieu riche (Bustamante *et al.*, 2001). L'opéron LEE5 est régulé négativement par des facteurs agissant directement sur le promoteur lors de croissance en milieu riche ou à des températures inférieures à 37°C (Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001).

### **3.2 EspC et ilot de pathogénicité *espC***

On retrouve dans le surnageant de culture des EPEC une protéine de 110 kDa, nommée EspC, qui n'est pas sécrétée par le système de sécrétion de type III (Jarvis *et al.*, 1995) contrairement à EspADDFG et Tir. Une souche possédant une mutation du gène *espC* garde sa capacité à réarranger le cytosquelette, à phosphoryler Tir et à adhérer aux cellules-hôtes, EspC n'est donc pas impliqué directement dans la formation des lésions AE (Stein *et al.*, 1996a).

L'analyse de la séquence d'acides aminés a démontré la présence d'une séquence en N-terminal qui possède plusieurs caractéristiques d'un peptide signal pouvant médier l'exportation Sec-dépendante de la protéine (Stein *et al.*, 1996a). Aussi, des homologies de séquences ont été remarquées entre EspC et des autotransporteurs membres de la famille des IgA protéases, incluant l'IgA protéase de *Neisseria gonorrhoeae* et l'entérotoxine Pet des EAEC (Mellies *et al.*, 2001). Les autotransporteurs assurent leur propre translocation par une exportation Sec-dépendante à travers la membrane cytoplasmique, suivie du clivage du peptide signal. Dans le périplasme, le domaine C-terminal de la protéine forme un tonneau  $\beta$  qui s'insère ensuite dans la membrane externe pour y former un pore. Le domaine passager (N-terminal) est transloqué, via le pore formé par le tonneau  $\beta$ , à la surface bactérienne où il peut demeurer intact ou être clivé pour être relâché à l'extérieur (Henderson and Nataro, 2001). Il faut noter que EspC ne possède pas d'activité IgA protéase mais joue plutôt un rôle d'entérotoxine puisque des surnageants contenant EspC

entraînent une augmentation de la différence de potentiel transépithélial (PD) et de la conductance totale du tissu (Isc) chez le jejunum du rat (Stein *et al.*, 1996a). Aussi, en Western blot, des anticorps dirigés contre Pet réagissent avec EspC, et une préincubation avec un antiserum contre Pet élimine la capacité d'EspC à causer une augmentation de PD et Isc (Mellies *et al.*, 2001).

Le gène *espC* n'est pas situé dans le LEE comme les autres *esp*, mais est plutôt localisé dans une région chromosomique de 15 195 pb, insérée dans un site adjacent au gène "tRNA-like" *ssrA* (Mellies *et al.*, 2001). Le contenu en G+C de la région de 15 kb est de 40,5 % par rapport à 50,8% pour *E. coli* K-12. Aussi, plusieurs cadres de lecture ouverts contenus dans la région sont similaires à des éléments génétiques mobiles. Toutes ces raisons mènent à penser que *espC* est situé dans son propre îlot de pathogénicité, qui a été nommé îlot de pathogénicité *espC* (Mellies *et al.*, 2001).

Cette région, située à environ 60 minutes par rapport au chromosome de *E. coli* K12, contient aussi un cadre de lecture ouvert (*orf3*) qui montre une identité de 19% et une homologie de 37% avec la séquence protéique de VirA de *Shigella flexneri*. VirA est impliquée dans l'invasion cellulaire et le passage de cellule en cellule (Uchiya *et al.*, 1995). Des séquences homologues à *espC* et à *orf3* ont été retrouvées chez des souches représentatives du sous-groupe EPEC1 mais pas chez les souches des groupes EPEC2, EHEC1, EHEC2, ni chez les souches RDEC-1 et *Citrobacter rodentium*. EspC n'est donc pas associé avec le phénotype AE (Mellies *et al.*, 2001; Stein *et al.*, 1996a).

#### **4. Système de sécrétion de type III**

Chez les bactéries à Gram négatif, le terme sécrétion décrit le transport actif de protéines du cytoplasme, au travers la membrane interne et la membrane externe, pour se retrouver dans le milieu extérieur. Il faut distinguer ce concept de celui d'exportation qui est plutôt un transport de protéines du cytoplasme vers le périplasme (Hueck, 1998).

Les bactéries pathogènes pour les animaux et les plantes utilisent surtout un système de sécrétion du type III (SSTT). Ce type de sécrétion est indépendant de la machinerie Sec, mais dépend du contact avec l'hôte (Galan and Collmer, 1999). Le SSTT devient un facteur de virulence permettant d'injecter les protéines bactériennes dans le cytoplasme de la

cellule-hôte. Ce système contient une homologie avec des gènes impliqués dans l'assemblage des flagelles, ce qui peut indiquer que le système est impliqué dans la synthèse d'un organelle à la surface bactérienne (Finlay and Falkow, 1997; Fivaz and van der Goot, 1999). Les protéines du système qui sont impliquées dans la sécrétion sont très conservées et peuvent même être interchangeables. Ainsi un SSTT peut souvent exporter les protéines habituellement sécrétées par un autre SSTT (Elliott *et al.*, 1999a; Rosqvist *et al.*, 1995). Des études de microscopie électronique des SSTT de *Shigella* et de *Salmonella* (SPI1) ont montré un complexe macromoléculaire qui inclut les deux membranes et qui consiste en une structure basale possédant quatre anneaux (deux supérieurs et deux inférieurs) qui sont connectés par une structure cylindrique, et avec une projection en forme d'aiguille vers l'extérieur (Blocker *et al.*, 2001; Kimbrough and Miller, 2000; Kubori *et al.*, 1998; Kubori *et al.*, 2000; Rosqvist *et al.*, 1995; Tamano *et al.*, 2000). Chez *Shigella*, MxiD, MxiG et MxiJ, et chez *Salmonella* PrgH, PrgK and InvG font partie de la structure basale, tandis que MxiH et PrgI (chez *Shigella* et *Salmonella* respectivement) font partie du complexe en aiguille (Blocker *et al.*, 2001; Kimbrough and Miller, 2000; Kubori *et al.*, 1998; Tamano *et al.*, 2000).

Les protéines exportées par le SSTT ne possèdent pas de peptide signal clivable et nécessitent la présence de chaperons qui font partie d'une famille de protéines appelées les chaperons de type III (Bennett and Hughes, 2000; Stein *et al.*, 1996a; Wattiau *et al.*, 1996). Il y a longtemps eu controverse sur la présence d'un signal de sécrétion chez les protéines sécrétées par un SSTT. Certains ont cru que le segment 5' de l'ARN messager servait de signal pour la sécrétion (Anderson and Schneewind, 1999). Il vient pourtant d'être prouvé chez *Yersinia* que malgré l'absence de séquence consensus, c'est le N-terminal qui est nécessaire pour la sécrétion et l'ARN messager n'y joue aucun rôle (Lloyd *et al.*, 2001; Lloyd *et al.*, 2002). Il semble que la meilleure séquence N-terminale favorisant la sécrétion est amphipatique et contient quatre ou cinq résidus sérine (Lloyd *et al.*, 2002).

Les EPEC se servent d'un système de type III pour la sécrétion des protéines impliquées dans la formation de lésions attachant-effaçant (Jarvis *et al.*, 1995). Ce système est encodé par les opérons LEE1, LEE2 et LEE3 du LEE. Six protéines sont exportées par le SSTT (EspA, EspB, EspD, EspF, Tir et Map) et trois d'entre elles font aussi partie de ce

système (Kenny *et al.*, 1997b; Kenny and Jepson, 2000; Wachter *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 1998). L'observation en microscopie électronique a permis de montrer que le SSTT des EPEC est formé d'un corps basal contenant deux anneaux qui semblent être dédoublés, et d'une projection en forme d'aiguille. Ce SSTT est similaire à ceux de *Salmonella* et *Shigella*. Cependant, les EPEC possèdent une aiguille beaucoup plus longue ainsi qu'une structure en forme de gaine au niveau de cette aiguille. La gaine est absente chez *Salmonella* et *Shigella* (Daniell *et al.*, 2001; Sekiya *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001). La structure de la gaine est majoritairement composée de EspA, puisque la longueur de la gaine est dépendante de la quantité disponible de EspA (Sekiya *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001). La largeur des anneaux interne et externe est respectivement de  $18,1 \pm 2,5$  nm et  $16,7 \pm 1,9$  nm et la hauteur du corps basal est de  $31,4 \pm 4,3$  nm (Sekiya *et al.*, 2001). La protéine EscF est nécessaire pour la sécrétion de EspA, EspB et EspD ainsi que pour la formation des lésions AE. Elle possède un rôle hémolytique et fait partie de l'aiguille (Sekiya *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001) Aussi, EscF a la capacité de lier EspA (Wilson *et al.*, 2001). EscJ et EscC (LEE1) montrent une homologie avec les protéines des anneaux internes et externes, respectivement des SSTT de *Shigella* et *Salmonella* (Tableau 1); (Wilson *et al.*, 2001).

Premièrement, les anneaux internes et externes s'assemblent, probablement via un mécanisme *sec* dépendant puisque le composant de l'anneau externe, EscC possède un peptide signal typique (Figure 5). Deuxièmement, EscF se polymérise, relie les anneaux internes et externes et forme l'aiguille, puis EspA est sécrété via le SSTT et s'attache au bout de l'aiguille probablement via son domaine spiralé ("coiled-coil", on note la présence d'au moins deux hélices  $\alpha$  enroulées l'une autour de l'autre) et se polymérise pour former la gaine (Sekiya *et al.*, 2001).

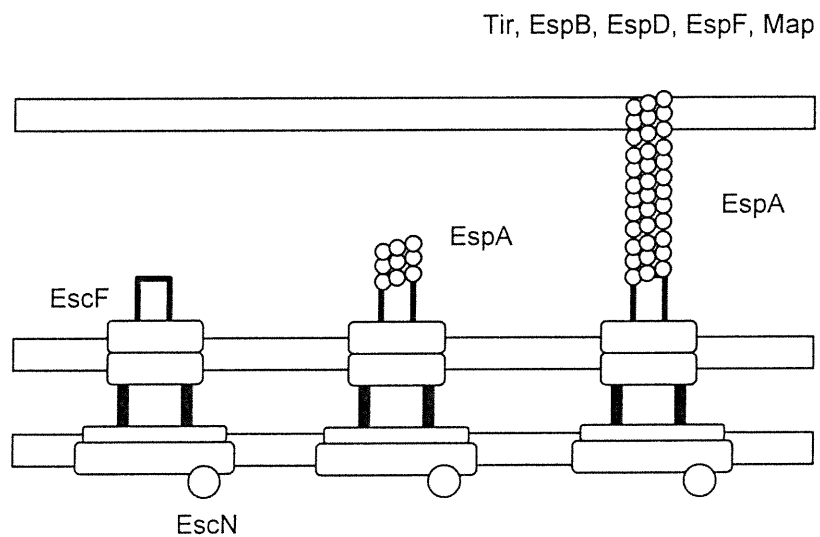


Figure 5 : Modèle proposé de l'assemblage du complexe de l'aiguille : Modifié à partir de Sekiya K. *et al.* PNAS 98(20) p. 11638-11643 et Wilson R.K. *et al.* Cellular Microbiol 3(11) p.753-762.

Tableau 1: Protéines du SSTT des EPEC et leurs homologues chez d'autres pathogènes (Pourcentage d'identité de séquence protéique entre parenthèses).

EPEC	<i>Yersinia</i>	<i>Shigella</i>	<i>Salmonella</i>	Localisation et/ou fonction possible
EscV [SepA]	LcrD (37%)	MxiA (38%)	InvA (35%)	Membrane interne? (Jarvis <i>et al.</i> , 1995)
EscN [SepB]	YscN (50%)	Spa47 (42%)	SpaL [InvC] (45%)	Cytoplasmique, fournirait l'énergie pour la translocation (Wilson <i>et al.</i> , 2001) (Jarvis <i>et al.</i> , 1995)
EscC [SepC]	YscC (31%)	MxiD (30%)	InvG (27%)	Serait exposé à la surface bactérienne, pores dans la membrane bactérienne? (Elliott <i>et al.</i> , 1998) (Frankel <i>et al.</i> , 1998; Jarvis <i>et al.</i> , 1995)
EscJ [SepD]	YscJ (36%)	MxiJ (29%)	MxiJ (37%)	Lipoprotéine? Lien entre membranes interne et externe (Hueck, 1998)
EscU [SepF]	YscU (36%)	Spa40 (31%)	SsaU (38%)	Membrane interne? (DeVinney <i>et al.</i> , 1999a)
EscT [SepG]	YscT (29%)	Spa29 (28%)	SsaT (34%)	Membrane interne? (DeVinney <i>et al.</i> , 1999a)
EscS [SepH]	YscS (35%)	Spa9 (34%)	SsaS (33%)	Membrane interne? (DeVinney <i>et al.</i> , 1999a)
EscR [SepI]	YscR (46%)	Spa24 (42%)	-	Membrane interne? (DeVinney <i>et al.</i> , 1999a)
SepZ	-	-	-	Protéine membranaire (Rabinowitz <i>et al.</i> , 1996)
SepQ	-	-	SsaQ (19%)	
EscF	YscF (26%)	MxiH (25%)	PrgI (24%)	Aiguille (Wilson <i>et al.</i> , 2001)
EspD	YopB (26%)			Insertion et pore dans membrane cellule-hôte (Ide <i>et al.</i> , 2001)
EspA				Filament pour translocation (Knutton <i>et al.</i> , 1998)
EspB	YopD			Pore dans membrane cellule-hôte (Ide <i>et al.</i> , 2001)
CesT	SycE, SycH, SycT, SycN		SicP	Cytoplasme bactérien, chaperon de Tir (Elliott <i>et al.</i> , 1999a)
CesD	SycD	IpgC	SicA	Cytoplasme bactérien, chaperon de EspD (Wainwright and Kaper, 1998)

Les premiers gènes identifiés furent *sepABCD* nommés ainsi pour "secretion of *E. coli* proteins". Le gène *sepA* (*escV*) encoderait une protéine de 72 kDa qui serait ancrée dans la membrane interne grâce à 6 à 8 segments transmembranaires. SepB (*EscN*) serait une protéine de 31,5 kDa et qui a des similarités avec des protéines qui fournissent l'ATP pour la sécrétion protéique. SepC (*EscC*) semble être une protéine de 56 kDa similaire à des protéines de la membrane externe, nécessaires pour la sécrétion de protéines. Sa région carboxy-terminale contient un site de liaison à l'ATP/GTP semblable à la boîte de Walker A (Walker box A). SepD (*EscJ*) possède un motif de clivage commun aux lipoprotéines (Jarvis *et al.*, 1995).

Les gènes ayant des homologies au SSTT de *Yersinia* ont été renommés *esc* (*E. coli* secretion), tandis que les gènes ne possédant pas d'homologies sont plutôt nommés *sep* (secretion of *E. coli* proteins); (Elliott *et al.*, 1998).

Les protéines impliquées dans la formation du SSTT ne sont pas toutes connues, le LEE pourrait encoder jusqu'à 19 protéines impliquées dans la sécrétion de type III (Elliott *et al.*, 1998).

## **5. Protéines impliquées dans la formation des lésions**

### **5.1 Intimine**

Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing) encode une adhésine de 94 kDa (939 acides aminés), insérée dans la membrane externe et nommée intimine (Jerse *et al.*, 1990; Jerse and Kaper, 1991). Les mutants  $\Delta eae$  ne peuvent s'attacher intimement aux cellules épithéliales, mais ils peuvent transmettre les signaux qui résultent dans la translocation et la tyrosine phosphorylation de Tir (Donnenberg and Kaper, 1991; Rosenshine *et al.*, 1992). Le gène *eae* est présent dans tous les EPEC, EHEC, *C. rodentium* et *H. alvei* causant les lésions attachant/effaçant, mais est absent chez les souches de *E. coli* de la flore normale, les souches ETEC et chez les autres bactéries ne causant pas de lésions AE. Les portions amino-terminales des différentes intimines (appartenant à EPEC, EHEC, *C. rodentium* et *H. alvei*) sont très conservées entre elles (identité de 84-87%) et avec les invasines de *Yersinia*



*pseudotuberculosis* et de *Yersinia enterocolitica* (Frankel *et al.*, 1994; Jerse *et al.*, 1990; Schauer and Falkow, 1993).

Les 280 acides aminés de la portion C-terminale (Int280) sont moins homologues entre eux (identité de 57-61%), et comme pour l'invasine, c'est la région où réside le domaine de liaison aux cellules-hôtes (Frankel *et al.*, 1994; Schauer and Falkow, 1993). La fonction liaison de ce domaine nécessite la présence de la cystéine-937 et de la cystéine-982 (Frankel *et al.*, 1995; Frankel *et al.*, 1996). Des études de cristallographie sur les 280 acides aminés C-terminaux de l'intimine- $\alpha$  ont permis de démontrer que Int280- $\alpha$  est formé de trois domaines: deux domaines (D2 et D3) qui ont une topologie semblable à la superfamille des immunoglobulines de type I (IgSF-like) et un domaine (D4) possédant une topologie similaire aux lectines de type C. Les deux domaines IgSF-like forment un adaptateur articulé qui permettrait une bonne présentation du troisième domaine. Ce dernier ressemble aux lectines de type C qui ont une fonction de reconnaissance des portions glucides des récepteurs à la surface des cellules animales ainsi que des toxines bactériennes. Le domaine D4 comprend aussi un pont disulfure (Cys278 - Cys201) nécessaire à la fonction liaison Tir-indépendante de l'intimine et qui est très conservé chez les lectines de type C (Batchelor *et al.*, 2000; Hartland *et al.*, 1999; Kelly *et al.*, 1999). Un quatrième domaine, nommé D1, situé entre les résidus 558 et 650 (donc ne fait pas partie de Int280), est aussi localisé dans la portion extracellulaire de l'intimine et sa séquence montre une identité de 35% avec le domaine D2 (Ig-like); (Batchelor *et al.*, 2000). La cristallographie du complexe intimine-Tir a montré que la liaison est médiée principalement par les interactions entre le domaine D4 (lectin-like) de l'intimine et la boucle  $\beta$  et le N-terminal de l'hélice  $\alpha$  de l'IBD (intimin binding domain) de Tir (Luo *et al.*, 2000)

### 5.1.1 Récepteurs de l'intimine

#### 5.1.1.1 Tir

Il a été démontré que Tir (Translocated intimin receptor) est transloqué dans la membrane de la cellule-hôte via le SSTT, est phosphorylé puis se lie à l'intimine pour déclencher une cascade de signaux menant aux réarrangements cytosquelettiques caractéristiques (Hartland *et al.*, 1999; Kenny *et al.*, 1997b). La région de liaison à Tir se

retrouve dans les 190 acides aminés en C-terminal de l'intimine, dans le domaine D4, mais dans une portion opposée aux deux cystéines formant le pont disulfure (Batchelor *et al.*, 2000; Luo *et al.*, 2000). Les résidus impliqués sont Y140, K142, I147, I148, S149, W150, T154, Q156, D157, A158, V162, A163, S164, T165, K170, Q171, N176, I177, S180, E181, N183, A184, Y185, T187 et V189 désignés par rapport à Int190 (Figure 6); (Batchelor *et al.*, 2000).

```

ffttltiddg nieivgtgvk gklptvwlqy gqvnkksagg ngkytwrsan paiaavdass gqvtlkekgt
ttisvisssdn qtatytiatp nslivpnmsk rvtynadvant cknfggklps sqnelenvfk awgaankyey
ykssqtiisw vqqtadaks gvastydvlk qnplnnikas esnayatcvk
*      ****      *  ***      ****      *  *      **  *  *  ***  *  *

```

Figure 6 : Les 190 derniers acides aminés de l'intimine. Les étoiles représentent les acides aminés impliqués dans la liaison à Tir. Adapté à partir de Batchelor M, *et al.* 2000, EMBO Journal 19(11) p.2452-2462.

### 5.1.1.2 Intégrines

*In vitro*, l'intimine se lie aussi aux intégrines de type  $\alpha_4\beta_1$  et  $\alpha_5\beta_1$  (Frankel *et al.*, 1996). Cette liaison se fait de façon optimale en présence d'ions  $Mn^{2+}$  et nécessite seulement les 150 derniers acides aminés de Int280, comprenant le pont disulfure, ce qui correspond au domaine D4 (Frankel *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1999). Les intégrines sont une famille de glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires qui ont la capacité de transmettre des signaux à travers la membrane plasmique après interaction avec divers ligands extracellulaires. Il y a au moins 20 différents types d'intégrines connues à ce jour, qui sont formés de neuf types de sous-unités  $\beta$  et de quatorze types de sous-unités  $\alpha$  (Alberts *et al.*, 1994). Ces observations laissent croire qu'il y aurait une interaction entre le domaine D4 et une portion glycosylée de la cellule-hôte, ce qui pourrait expliquer le tropisme des EPEC pour certains tissus (Kelly *et al.*, 1999). Une autre équipe conteste le fait que l'intimine interagirait avec une portion glycosylée de la cellule-hôte, car le domaine D3 ne possède pas les résidus acides pouvant lier le calcium et qui sont nécessaires aux lectines de type C pour lier les glucides (Luo *et al.*, 2000).

Les entérocytes humains ne possèdent pas d'intégrines  $\beta_1$ . Le rôle de la liaison intimine-intégrine reste donc à être déterminé (Beaulieu, 1992). Cependant, les cellules M

retrouvées dans l'intestin expriment des intégrines  $\beta_1$  à leur surface. Ce sont ces cellules qui sont ciblées par l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* (Clark *et al.*, 1998), ce qui laisse une possibilité d'interaction entre les EPEC via leur intimine et les cellules M du système immunitaire (Kenny, 1999).

#### 5.1.1.3 Nucléoline

L'intimine- $\gamma$  des souches EHEC O157:H7 peut lier une protéine de l'hôte : la nucléoline des cellules HEp-2. La nucléoline est une protéine impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et la biogénèse des ribosomes (Ginisty *et al.*, 1999). Elle est surtout associée au noyau mais est aussi retrouvée en surface de la cellule, et cette nucléoline de surface pourrait servir de récepteur pour plusieurs virus (de Verdugo *et al.*, 1995; Orrick *et al.*, 1973; Sorokina and Kleinman, 1999). Des anticorps anti-nucléoline ont bloqué *in vitro* l'attachement des EHEC aux cellules HEp-2 (Sinclair and O'Brien, 2002). C'est la partie C-terminale de l'intimine- $\gamma$  qui lierait la nucléoline (Sinclair and O'Brien, 2002). La nucléoline pourrait être impliquée dans la transmission de signaux de la surface cellulaire au noyau (Zhou *et al.*, 1997). Il est donc possible que l'interaction intimine- $\gamma$  et nucléoline soit impliquée dans la réponse de l'hôte qui mène à la formation de piédestaux (Sinclair and O'Brien, 2002).

#### 5.1.2 Tropisme tissulaire et spécificité d'hôte

Puisque l'intimine possède une activité de liaison indépendante de Tir, la protéine serait aussi impliquée dans le tropisme tissulaire des différentes souches qui l'expriment (An *et al.*, 1997; Deibel *et al.*, 2001; Frankel *et al.*, 1994; Frankel *et al.*, 1995; Reece *et al.*, 2001). Les souches EPEC ou EHEC exprimant l'intimine  $\alpha$  colonisent toutes les muqueuses de l'intestin grêle, contrairement aux souches EPEC ou EHEC exprimant l'intimine  $\gamma$ , qui adhèrent plutôt au FAE (follicule associated epithelium) des plaques de Peyer. Cependant, d'autres facteurs pourraient être impliqués dans le tropisme (Phillips and Frankel, 2000; Phillips *et al.*, 2000). L'intimine pourrait aussi contribuer à la spécificité d'hôte puisque qu'une souche de *Citrobacter rodentium*, exprimant normalement l'intimine  $\beta$ , modifiée

pour produire l'intimine  $\gamma$  d'une souche EHEC, ne peut plus infecter les souris, son hôte habituel (Hartland *et al.*, 2000b).

### 5.1.3 Régulation de l'expression de l'intimine

Il y a une augmentation de l'expression de l'intimine pendant la phase exponentielle de croissance puis son expression diminue suivant l'adhésion de la bactérie aux cellules-hôtes. L'expression serait régulée par des facteurs environnementaux (possiblement les ions calcium et ammonium) pendant la croissance bactérienne, et par des facteurs de la cellule-hôte pendant l'adhésion de la bactérie. Le facteur Per semble être impliqué puisqu'il n'y a pas de diminution d'expression quand les gènes *per* sont absents. (Knutton *et al.*, 1997).

### 5.1.4 Types d'intimine

L'intimine est soumise à la variation antigénique, il en existe au moins cinq différents sous-types, soit  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  (Adu-Bobie *et al.*, 1998; Oswald *et al.*, 2000). Le premier exprime l'intimine  $\alpha$ , et comprend les souches de sérotype O55:H6, O127:H6, O142:H6 et O142:H34 et *H. alvei*. Toutes ces souches font partie du sous-groupe clonal EPEC1, sauf *H. alvei*. Un deuxième groupe possède l'intimine  $\beta$ , et inclut les sérotypes O26:H- O111:H2, O111:H-, O114:H2, O119:H2, O119:H6 et O128:H2, les souches RDEC-1 et *Citrobacter rodentium*. Toutes ces souches sauf celles appartenant au sérotype O119:H6 et RDEC-1 et *C. rodentium* font partie des sous-groupes EPEC2 et EHEC2. L'intimine  $\gamma$  est retrouvée chez les souches EHEC O157:H7, EPEC O55:H- et O55:H7. L'intimine  $\delta$  est retrouvée chez les souches EPEC O86:H34 (Adu-Bobie *et al.*, 1998). Plus tard, un cinquième type d'intimine a été identifié et nommée  $\epsilon$ . On la retrouve chez les souches EHEC humaines et bovines de sérotypes O8, O11, O45, O103, O121 et O165 (Oswald *et al.*, 2000).

## **5.2 EspA**

EspA est une protéine de 25 kDa qui est encodée par le LEE et est sécrétée par le système de sécrétion du type III. Chez EPEC E2348/69 EspA forme, à la surface bactérienne, des grands filaments de 50 nm de diamètre et jusqu'à 2  $\mu$ m de long. Ces

filaments semblent assez rigides mais possèdent une "charnière" ancrée à la surface (Knutton *et al.*, 1998). Des études en immunofluorescence ont démontré que les filaments EspA forment un lien direct entre la bactérie et la surface de la cellule-hôte *in vitro*, mais aucun récepteur pour le filament n'a été identifié. Les filaments EspA disparaissent lorsque les lésions AE sont bien formées, ce qui suggère que leur expression soit régulée, possiblement par des facteurs provenant de la cellule-hôte ou, tout simplement, par la phase de croissance (Knutton *et al.*, 1998). Aussi, les filaments EspA sont nécessaires pour la translocation de EspB (Knutton *et al.*, 1998) et de Tir (Kenny *et al.*, 1997b), mais le mécanisme de la translocation n'est pas connu. EspA servirait à transporter des molécules entre la bactérie et la cellule-hôte (Knutton *et al.*, 1998); (Shaw *et al.*, 2001).

Différentes étapes de l'expression du filament EspA ont été répertoriées pendant la formation de lésions AE chez des cellules en culture. Premièrement, les filaments EspA sont exprimés lorsque les bactéries sont cultivées en milieu DMEM, mais sans cellules-hôtes. Deuxièmement, la bactérie forme un attachement non-intime avec les cellules-hôtes via le pont formé par le filament EspA. Troisièmement, la bactérie induit une lésion AE typique. On ne retrouve alors plus de filaments EspA au site d'attachement intime, mais ils sont présents sur le reste de la surface de la bactérie. Finalement, les filaments EspA restants disparaissent de la surface bactérienne pour laisser place à une lésion AE bien développée (Knutton *et al.*, 1998).

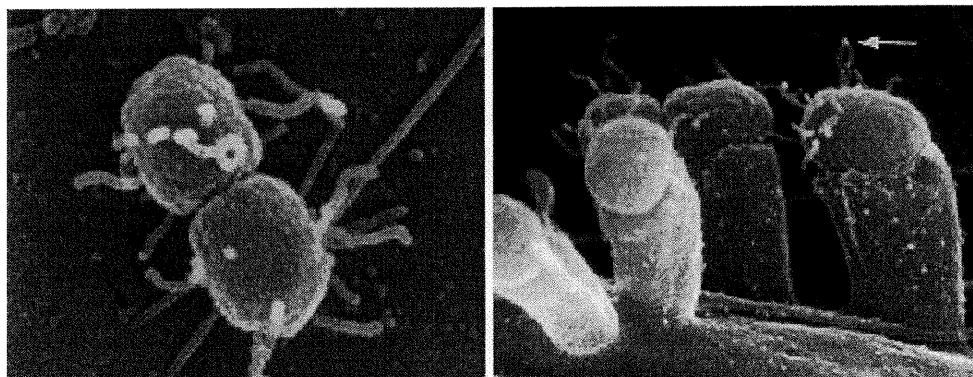


Figure 7 : Photos de microscopie électronique à transmission montrant la souche JPN15 (EPEC) adhérente à des cellules HEL (human embryonic lung). Les flèches montrent les filaments de EspA. Photos tirées de Knutton S, *et al.* 1998 EMBO Journal 17(8) : 2166-2176.

Il y a une similarité entre EspA et les flagellines de plusieurs espèces bactériennes, ce qui peut suggérer que l'assemblage du filament EspA puisse se faire d'une façon comparable à celui des flagelles et pili. La similarité entre EspA et les flagellines se retrouve dans la partie C-terminale, dans laquelle se retrouverait un domaine spiralé (coiled-coil); (Pallen *et al.*, 1997). Les domaines "coiled-coil" favorisent l'oligomérisation de monomères via l'association d'hélices- $\alpha$ . Les segments "coiled-coil" ont été prédits pour plusieurs protéines (dont EspA, EspB et EspD) associées à des systèmes de sécrétion du type III (Pallen *et al.*, 1997). Ce domaine est nécessaire pour la multimérisation des monomères de EspA dans le but de former les filaments (Delahay *et al.*, 1999). EspB n'est pas requis pour la multimérisation (Knutton *et al.*, 1998). De son côté, EspD serait nécessaire à l'élaboration du filament du côté de la membrane bactérienne (Knutton *et al.*, 1998). EspD serait ensuite transporté à la membrane de la cellule-hôte où il pourrait médier des interactions structurelles avec EspA (puisque EspD possède deux régions "coiled-coil" prédites), présentant ainsi un mécanisme par lequel le filament EspA pourrait être ancré à la surface de la cellule-hôte (Delahay *et al.*, 1999).

Des filaments semblables à EspA (les invasomes) sont visibles à la surface de *S. typhimurium* (Ginocchio *et al.*, 1994). Les filaments EspA et les invasomes ont une structure et une taille semblables. Leur sécrétion dépend tous les deux d'un système de sécrétion du type III et sont détruits après l'induction d'un changement chez l'hôte (formation de lésions AE pour les EPEC et "membrane ruffling" chez *Salmonella*). Pourtant, les invasomes ne sont produits seulement qu'après exposition aux cellules-hôtes tandis que les filaments EspA apparaissent même en absence de cellule-hôte. De plus, les invasomes apparaissent et disparaissent en moins de 30 minutes après l'infection, tandis que chez les EPEC, l'apparition et la disparition des filaments EspA se fait plutôt sur une période de quelques heures (Ginocchio *et al.*, 1994; Knutton *et al.*, 1998).

Aussi, EspA, à cause de sa structure filamenteuse, jouerait un certain rôle dans l'adhérence via l'interaction entre le filament et un récepteur, encore inconnu, à la surface de la cellule-hôte. Une souche ne possédant pas le BFP montre un faible attachement initial qui pourrait être attribué au filament EspA (Knutton *et al.*, 1998).

Les mutants  $\Delta espA$  (de la souche REPEC O103) n'accumulent pas d'actine cytosquelettique et n'induisent aucun évènement de phosphorylation de tyrosine des protéines sous la bactérie adhérente, lors de l'infection expérimentale de cellules HeLa. Aussi, *in vivo*, les lapins infectés avec le mutant  $\Delta espA$  ne développent aucune diarrhée. L'examen histologique des tissus intestinaux des lapins infectés avec la souche mutante n'a démontré aucune lésion caractéristique des EPEC, tandis que les tissus des animaux infectés avec la souche sauvage ont montré des lésions AE typiques. Ces résultats démontrent que EspA est nécessaire pour le déclenchement des lésions AE *in vivo* (Abe *et al.*, 1998).

La comparaison des séquences protéiques de EspA de plusieurs isolats cliniques avec la souche E2348/69 montre une identité globale de 65% (Neves *et al.*, 1998).

### 5.3 EspD

Le gène *espD* est situé entre *espA* et *espB* dans le LEE. Il encode une protéine de 381 acides aminés (39,5 kDa) qui est sécrétée par le SSTT. Deux séquences transmembranaires et un domaine "coiled-coil" en C-terminal ont été identifiés (Pallen *et al.*, 1997). EspD ne contient pas l'abondance relative de sérine et thréonine retrouvée chez EspA et EspB (Lai *et al.*, 1997). Une souche mutante  $\Delta espD$  est incapable d'induire l'accumulation d'actine ou les signaux menant à la tyrosine phosphorylation de Tir (Hp90) et réduit la sécrétion de EspA et EspB (Lai *et al.*, 1997). De plus, le mutant  $\Delta espD$  produit des filaments EspA plus courts et qui ont une adhésion réduite aux cellules-hôtes. Ceci suggère que EspD est associé au filament soit pour sa formation ou sa stabilisation (Knutton *et al.*, 1998). Aussi, EspD interagit *in vitro* avec EspB, probablement via leurs domaines coiled-coil respectifs (Ide *et al.*, 2001).

La protéine EspD de la souche O157:H7 EDL933 montre une identité de 25% et une homologie de 42% avec YopB de *Yersinia* (Kresse *et al.*, 1999). De plus, les deux protéines possèdent des structures similaires. Les deux ont le même patron d'hydrophobicité et leurs domaines coiled-coil ainsi que leurs segments transmembranaires sont retrouvés dans des sites presque identiques. La région centrale hydrophobe de YopB a une structure similaire à celle des protéines formant des pores et faisant partie de la famille

des hémolysines (Hakansson *et al.*, 1993). Cette même région est retrouvée chez EspD (Wachter *et al.*, 1999). De plus, YopB possède une activité hémolytique contact-dépendante et serait impliquée dans la formation d'un appareil de translocation chez *Yersinia* (Hakansson *et al.*, 1996).

EspD est insérée dans la membrane cytoplasmique de l'hôte et la majorité de la protéine est exposée à la surface de la cellule (Wachter *et al.*, 1999). Considérant la position des deux régions transmembranaires, le domaine coil-coiled devrait être extracellulaire, ce qui pourrait permettre une interaction EspD-EspD, ou avec d'autres protéines possédant un motif coil-coiled dans le but, par exemple, de former un pore. Aussi puisque EspA contient un motif coil-coiled, EspA et EspD pourraient interagir pour permettre le contact entre le SSTT et l'hôte (Fivaz and van der Goot, 1999; Shaw *et al.*, 2001; Wachter *et al.*, 1999). EspD créerait donc un pore, probablement en association avec EspB, pour permettre la translocation d'effecteurs dans le cytoplasme de la cellule-hôte. Le pore aurait un diamètre externe de 55 à 80 nm et semble être constitué de 6 à 8 sous-unités (Ide *et al.*, 2001).

#### 5.4 EspB

Une mutation isogénique (chez une souche EPEC) inactivant le gène *eaeB* (maintenant appelé *espB*) rend la bactérie incapable de s'attacher intimement aux cellules-hôtes et donc celle-ci n'induit plus d'accumulation de l'actine et de phosphorylation de Tir *in vitro* (Donnenberg *et al.*, 1993b; Foubister *et al.*, 1994). Des tests *in vivo* ont montré que EspB est nécessaire pour les réarrangements du cytosquelette et les lésions AE subséquentes (Abe *et al.*, 1998). Le mutant  $\Delta espB$  a un phénotype très similaire à celui du mutant isogénique pour *eae*. C'est le deuxième gène impliqué dans l'attachement des EPEC aux cellules-hôtes à avoir été identifié (Donnenberg *et al.*, 1993b). Le gène *espB* contient 966 pb et code pour une protéine de 33,1 kDa. En N-terminal, une séquence de 20 nucléotides contient une abondance de sérine ou thréonine (Donnenberg *et al.*, 1993b). EspB a une homologie de séquence avec YopD de *Yersinia* et les deux protéines ont une fonction de lyse globules rouges (Warawa *et al.*, 1999). EspB est transloqué au cytoplasme des cellules infectées et adopte une forme résistante aux protéases après contact entre la bactérie et la cellule-hôte (Kenny and Finlay, 1995; Taylor *et al.*, 1998). La sécrétion



semble contact-dépendante et nécessite la présence du SSTT et des protéines EspA et EspD (Taylor *et al.*, 1998). EspB peut se lier à EspA, mais cette liaison n'est pas nécessaire pour qu'il y ait interaction entre EspA et la cellule-hôte (Hartland *et al.*, 2000a). EspB ne colocalise pas directement avec l'actine mais s'en retrouve à proximité ce qui suggère que la fonction d'EspB ne soit pas de lier l'actine (Abe *et al.*, 1998). EspB est requis pour l'apparition de changements dans l'activité électrique des cellules épithéliales polarisées et la dépolarisation de cellules Caco-2 (Collington *et al.*, 1998a; Stein *et al.*, 1996b). Ces effets pourraient refléter les flux d'ions qui causent la diarrhée *in vitro*. EspB est aussi nécessaire pour l'activation de NF- $\kappa$ B, la sécrétion d'interleukine 8, la migration transépithéliale des neutrophiles et pour une diminution de la résistance électrique transépithéliale. Tous ces changements pourraient contribuer à l'apparition de la diarrhée (Savkovic *et al.*, 1996, 1997; Yuhan *et al.*, 1997). La transfection d'un vecteur produisant EspB dans les cellules HeLa, amène un changement dans la morphologie de la cellule et la réorganisation de fibres de stress, ce qui pourrait suggérer que EspB joue aussi un rôle de toxine du cytosquelette (Taylor *et al.*, 1999). EspB a aussi été détectée dans la membrane cytoplasmique de l'hôte, où elle formerait un pore permettant la translocation d'effecteurs, en association avec EspD (Frankel *et al.*, 1998; Wolff *et al.*, 1998).

Récemment, des études d'infection expérimentale sur des volontaires humains ont montré que la diarrhée se développait chez seulement 10% (une personne sur dix) des volontaires ayant ingéré une souche  $\Delta espB$ , tandis que 90% des volontaires (neuf sur dix) ayant ingéré la souche sauvage ont souffert de diarrhée (Tacket *et al.*, 2000).

Tout comme pour l'intimine, EspB possède différents sous-types qui ont été détectés par l'analyse des séquences publiées, soit *espB- $\alpha$* , *espB- $\beta$*  et *espB- $\gamma$*  (Cid *et al.*, 2001). Le sous-type *espB- $\alpha$*  est retrouvé chez les souches EPEC E2348/69 et la souche canine 4221. Le sous-type *espB- $\beta$*  est retrouvé chez les souches lapines RDEC-1 et B10, les souches STEC bovines 413/89-1 et la souche EPEC porcine 86-1390. Le sous-type *espB- $\gamma$*  a été identifié chez la souche EHEC EDL933 (Cid *et al.*, 2001).

### 5.5 Régulation de l'expression de *espADB*

Les gènes *espADB* sont organisés sous forme d'opéron. Un promoteur situé à 94 pb en amont de *espA* contrôle l'expression des gènes. L'activation du promoteur est maximale en début de la phase logarithmique et diminue légèrement pendant la phase stationnaire. Le promoteur est aussi activé après contact avec la cellule-hôte, en réponse à la présence de calcium et par le régulateur Ler (Beltrametti *et al.*, 1999; Mellies *et al.*, 1999; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001). La transcription de l'opéron semble être régulée négativement lorsque la bactérie a adhéré de façon intime à la cellule-hôte (Beltrametti *et al.*, 1999). L'expression des gènes chez les différentes souches les possédant est régulée par la température correspondant à la température corporelle de leurs hôtes spécifiques (Ebel *et al.*, 1996; Kenny and Finlay, 1995). Chez les EPEC (E2348/69), la sécrétion maximale de EspA et EspB est retrouvée à 36°C, tandis que chez la souche RDEC-1 infectant les lapins (qui ont une température de 39°C), on retrouve une meilleure sécrétion à 39°C (Abe *et al.*, 1997). Aussi, la sécrétion des Esp est maximale dans des conditions similaires à celles du tractus gastrointestinal. Les EPEC ne sont pas soumises à un effet régulateur du CO<sub>2</sub>, mais sont stimulées par la présence de calcium, de bicarbonate de sodium, de concentration millimolaires de Fe(NO<sub>3</sub>) ainsi que par un pH neutre. On pourrait donc imaginer le trajet des EPEC dans le tractus digestif comme suit : Le pH acide de l'estomac inhibe la sécrétion des Esp, puis dès l'arrivée dans l'intestin grêle, l'acidité est neutralisée par des solutions concentrées en bicarbonate de sodium, produites par le pancréas et la muqueuse intestinale. Le pH, maintenant neutre, favorise la sécrétion des Esp (Kenny *et al.*, 1997a).

### 5.6 EspF

Le gène *espF* est retrouvé en aval de *espB* dans le LEE et possède 624 paires de bases. Il code pour une protéine d'environ 20,9 kDa qui possède trois motifs presque identiques et riches en proline. La protéine possède des similarités avec des protéines eucaryotes qui sont impliquées dans les signaux via tyrosine kinase et les réorganisations du cytosquelette (Donnenberg *et al.*, 1997b). EspF possède plusieurs caractéristiques en commun avec les autres Esp : sa synthèse est influencée par les conditions de croissance (synthèse en milieu de culture de tissus et non en milieu LB), et la protéine est sécrétée par

le système de type III des EPEC (McNamara and Donnenberg, 1998). Pourtant, le mutant  $\Delta espF$  garde sa capacité d'infecter les cellules épithéliales de l'hôte, d'induire la tyrosine phosphorylation de Tir et de réarranger les filaments d'actine au site d'attachement de la bactérie. La présence de EspF n'est donc pas nécessaire pour la formation des lésions AE (McNamara and Donnenberg, 1998). La séquence protéique de EspF de la souche EPEC E2348/69 montre 93,4% d'identité avec EspF de la souche EHEC EDL933, 82% d'identité avec RDEC-1 et 76% d'identité avec la souche lapine O103:H2. De façon intéressante, le nombre de motifs riches en proline varie selon les différentes souches, par exemple on en retrouve deux chez RDEC-1, trois chez E2348/69 et quatre chez EDL933 (Crane *et al.*, 2001). Ces motifs riches en proline, similaires aux domaines SH3, suggèrent que EspF interagit directement avec une protéine intracellulaire de l'hôte, mais cette dernière n'a pas encore été identifiée. Récemment, il a été démontré qu'EspF est transloquée dans le cytoplasme de la cellule-hôte (McNamara *et al.*, 2001). La capacité des EPEC à perturber la résistance électrique des cellules épithéliales (TER), à augmenter la perméabilité de cellules épithéliales intestinales en monocouches et à redistribuer l'occludine, une protéine associée aux jonctions serrées, nécessite la présence du gène *espF*. La perte de TER fait partie d'une des hypothèses pour expliquer le mécanisme de la diarrhée causée par les EPEC. De façon intéressante, il a été montré qu'en complétant le mutant avec un gène *espF* inductible, il y a une corrélation entre la quantité d'EspF produite et le degré de diminution du TER. On peut en conclure qu'EspF est nécessaire à la perturbation de la fonction de barrière des cellules épithéliales intestinales de l'hôte, mais il n'a pas encore été prouvé qu'EspF est la seule responsable de cette fonction (McNamara *et al.*, 2001).

Il a récemment été montré que les EPEC peuvent induire la mort des cellules hôte par un (ou des) mécanisme(s) qui ressemble(nt) à l'apoptose et à la nécrose (Crane *et al.*, 1999). Il semble que EspF serait impliqué dans la partie apoptose de ce phénomène puisqu'un mutant *espF* perd presque totalement sa capacité à induire la mort cellulaire (Crane *et al.*, 2001). La mort des cellules-hôtes induite par EspF est très semblable à l'apoptose uniquement. Il semblerait donc qu'en plus de EspF, les EPEC possèderaient un autre facteur impliqué dans la mort des cellules-hôtes (Crane *et al.*, 2001). Ce facteur pourrait être le SSTT qui cause des dommages à la membrane de l'hôte ce qui pourrait

expliquer la mort cellulaire "non-apoptose" (Warawa *et al.*, 1999). Le mécanisme par lequel EspF induit l'apoptose n'est pas encore connu (Crane *et al.*, 2001).

### 5.7 EspG

Anciennement connu sous le nom de *rorf2*, *espG* est situé dans le LEE et est très conservé chez les pathogènes causant les lésions AE (Elliott *et al.*, 2001). Le gène encode une protéine de 44 kDa qui possède 21% d'identité et 40% de similarité avec VirA de *Shigella*. VirA est sécrétée par un SSTT et serait un facteur accessoire lors de l'invasion (Demers *et al.*, 1998; Uchiya *et al.*, 1995). Il semble que VirA serait important dans les stades tardifs de l'infection, par exemple lors de la persistance intracellulaire et de la dissémination vers d'autres cellules (Demers *et al.*, 1998). EspG ne fait pas partie intégrante de la structure du SSTT mais est retrouvé dans le cytoplasme de cellules HEP-2, où la protéine pourrait jouer un rôle d'effecteur. Une mutation  $\Delta espG$  n'affecte pas la virulence des EPEC *in vivo* (Elliott *et al.*, 2001). Un mutant  $\Delta virA$  de *Shigella* voit sa survie intracellulaire diminuer de 80% en comparaison avec la souche sauvage. La complémentation de ce mutant  $\Delta virA$  par *espG* cloné à partir d'une souche EPEC amène la restauration du phénotype sauvage. EspG peut donc se substituer à VirA (Elliott *et al.*, 2001). Puisque l'invasion chez les EPEC est différente de celle retrouvée chez *Shigella*, le nombre de bactéries internalisées, plutôt que la persistance intracellulaire, a été étudié chez les EPEC. Il a été démontré qu'une mutation  $\Delta espG$  ne diminue pas drastiquement le nombre de bactéries internalisées (83% du phénotype sauvage), ce qui se compare bien au fait que la mutation de *virA* ne diminue pas non plus le nombre de bactérie internalisées dans le cas de *Shigella* (Elliott *et al.*, 2001). Le fait qu'une souche EHEC O157:H7 (souche 85-170) possède *espG* et ne soit pas invasive appuie l'idée que EspG n'est pas impliquée dans l'invasion à proprement dit (Elliott *et al.*, 2001). Lors d'une infection expérimentale chez les lapins, la souche REPEC 83/39 mutée pour *espG* a été utilisée. Le peu de différences entre la virulence des souches mutante et sauvage n'était même pas statistiquement significatif (Elliott *et al.*, 2001). Pourtant, environ un log supplémentaire de bactéries ont été récupérées dans les fèces des lapins infectés par la souche sauvage par rapport à ceux infectés par la souche  $\Delta espG$ . Cette différence suggère un rôle accessoire

dans la colonisation pour EspG, mais elle n'est pas suffisante pour déterminer l'effet de EspG dans la virulence (Elliott *et al.*, 2001). Il est possible que la présence d'un homologue de *espG* chez EPEC soit responsable de l'incapacité à délimiter le rôle de EspG. De fait, un deuxième homologue de VirA/EspG a été identifié et nommé *orf3*. Ce gène est situé en amont de *espC* dans l'ilôt de pathogénicité EspC (Mellies *et al.*, 2001). Orf3 peut aussi compléter un mutant  $\Delta virA$  chez *Shigella* (Elliott *et al.*, 2001). Un double mutant  $\Delta espG$  et  $\Delta orf3$ , est identique à la souche sauvage pour la génèse du phénomène d'attachement-effacement (test FAS) et pour l'adhérence localisée à des cellules HEp-2. La double mutant n'a que faiblement atténué l'invasion chez les EPEC (Elliott *et al.*, 2001). Le rôle de EspG / Orf3 dans la virulence des EPEC est donc encore nébuleux, mais il serait surprenant qu'un organisme maintienne deux gènes orthologues dans deux ilôts de pathogénicité si aucun des deux n'a de fonction (Elliott *et al.*, 2001). De plus, l'expression de *espG* est activée par le régulateur Ler (Elliott *et al.*, 2000). Il est donc toujours probable que EspG joue un rôle accessoire dans la virulence.

### **5.8 Tir (translocated intimin receptor)**

Tir, anciennement nommée Hp90, est aussi appelé EspE chez les EHEC (Deibel *et al.*, 1998; Kenny *et al.*, 1997b). La protéine est encodée par l'opéron LEE5, est transloquée dans le cytoplasme de la cellule-hôte via le SSTT puis insérée dans sa membrane plasmique (Kenny *et al.*, 1997b). Ce processus nécessite les protéines EspA, EspB et EspD qui génèrent un translocon permettant le transfert de Tir et d'autres effecteurs directement dans le cytoplasme de l'hôte (Hartland *et al.*, 2000a; Knutton *et al.*, 1998; Kresse *et al.*, 1999; Warawa *et al.*, 1999).

Tir contient deux séquences transmembranaires présumées (résidus 234-254 et 363-382) et six résidus tyrosine dans sa moitié C-terminale (Kenny *et al.*, 1997b). Un modèle de la topologie de Tir a pu être proposé en situant les extrémités amino et carboxy terminales dans le cytoplasme de la cellule-hôte et le domaine servant à la liaison de l'intimine se retrouvant dans une boucle extracellulaire de 109 acides aminés (DeVinney *et al.*, 1999a) (Kenny, 1999).

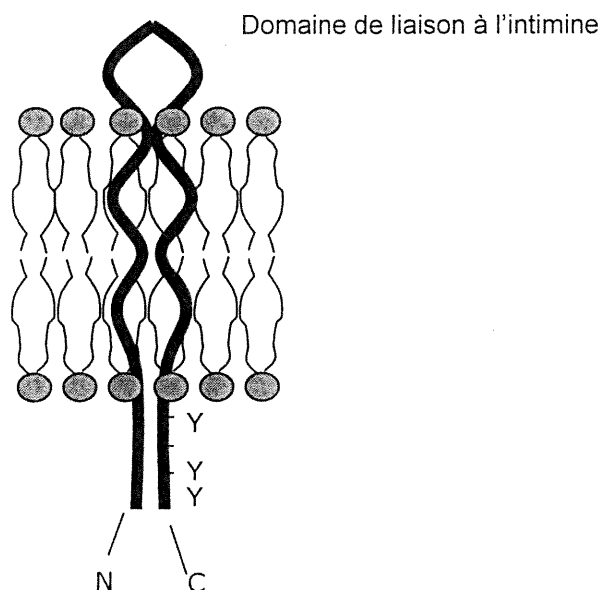


Figure 8 : Modèle en épingle à cheveux de la structure de Tir. Adapté à partir de DeVinney *et al.*, Cell. Mol. Life Sci 55 (1999) 961-976

Le domaine de liaison à l'intimine ou IBD (Intimin binding domain) correspond selon de Grado *et al* à une région de 109 acides aminés, localisée dans la région centrale de Tir (acides aminés 254-363), qui forme une boucle à la surface cellulaire (de Grado *et al.*, 1999). Hartland *et al* ont plutôt délimité une région de 107 acides aminés désignés Tir-M (Hartland *et al.*, 1999). Par ailleurs, Kenny a identifié une région de 55 acides aminés qu'il a nommé TIBA, pour Tir-intimin binding area, située entre les résidus 277-332 (Kenny, 1999). Des études de cristallographie ont permis de démontrer que l'IBD a une forme en épingle à cheveux composée de deux longues hélices- $\alpha$  et d'une boucle- $\beta$  (Luo *et al.*, 2000).

La portion N-terminale de Tir est nécessaire pour sa stabilité et pour la sécrétion de la protéine et, une fois Tir insérée dans la membrane cytoplasmique de l'hôte, le N-terminal, devient cytoplasmique (Abe *et al.*, 1999; de Grado *et al.*, 1999; Gauthier *et al.*, 2000). Les deux domaines transmembranaires sont nécessaires pour la localisation membranaire de Tir, tandis que l'IBD et la tyrosine phosphorylation n'y jouent aucun rôle (Gauthier *et al.*, 2000).

Tir existe sous différentes formes : la forme non-modifiée ( $T^0$ ,  $\approx 78$  kDa) est retrouvée dans la fraction cytoplasmique de l'hôte, la fraction membranaire et la fraction insoluble (elle contient des bactéries adhérees, le noyau et le cytosquelette de l'hôte). La forme modifiée  $T'$  ( $\approx 83$  kDa) est retrouvée dans les fractions cytoplasmique et membranaire, tandis que la forme  $T''$  et tyrosine phosphorylée ( $T''^{pY}$ ) qui ont toutes les deux un poids moléculaire de  $\approx 85$  kDa sont détectées dans les fractions membranaire et insoluble (Kenny and Finlay, 1997; Kenny and Warawa, 2001). Lorsque Tir est introduit dans la cellule-hôte par un système artificiel (EPEC-indépendant), on observe seulement la modification menant à la forme  $T'$ , induite par la protéine kinase A de l'hôte. Les modifications subséquentes sont donc dépendantes de facteurs additionnels provenant de la bactérie (Kenny and Warawa, 2001; Warawa and Kenny, 2001). Puisque la forme  $T'$  ne peut pas interagir avec l'intimine, on croit qu'elle n'est pas encore bien insérée au travers la membrane de l'hôte (Kenny, 1999; Kenny and Warawa, 2001). *In vitro*, la protéine kinase A (PKA) de l'hôte phosphoryle la sérine 434 de Tir, ce qui occasionne une augmentation de  $\approx 5$  kDa du poids moléculaire ( $T^0 \rightarrow T'$ ), puis phosphoryle la sérine 463 pour une addition de  $\approx 2$  kDa au poids moléculaire ( $T' \rightarrow T''$ ). L'ajout d'un phosphate sur un résidu devrait augmenter la masse moléculaire totale de  $\approx 0,1$  kDa. Le fait que les augmentations observées soient plutôt de 2 et 5 kDa suggère que les événements de phosphorylation sont accompagnés de changements conformationnels de la protéine (Warawa and Kenny, 2001). La sérine 434 n'est pas nécessaire pour la fonction de nucléation de l'actine, mais est requise pour une élongation efficace du piédestal (Warawa and Kenny, 2001).

Chez les EPEC, la phosphorylation de la tyrosine 474 ainsi que la présence des régions adjacentes à la tyrosine sont nécessaires pour l'activité de nucléation de l'actine

(Gauthier *et al.*, 2000; Goosney *et al.*, 2000b). Cette modification n'affecte pas le poids moléculaire de la protéine (Kenny, 1999). La liaison Tir-intimine n'est pas nécessaire pour que Tir soit phosphorylé (de Grado *et al.*, 1999). Un mutant EPEC  $\Delta tir$  ne peut pas être complété par *tir* provenant des EHEC, car il n'y a plus d'activité nucléation de l'actine (DeVinney *et al.*, 2001; Kenny, 2001).

Tir, une fois inséré dans la membrane de la cellule-hôte, interagit directement et spécifiquement avec Nck, une protéine de l'hôte. Nck est une protéine adaptateur possédant des domaines SH2/SH3 lui permettant de relier les récepteurs tyrosine phosphorylés au cytosquelette d'actine. Elle interagit avec la tyrosine 474 phosphorylée. Nck est nécessaire pour qu'il y ait formation de piédestaux (Gruenheid *et al.*, 2001). La phosphorylation de la tyrosine permet aussi le recrutement de deux composants importants du cytosquelette soit N-WASP et le complexe Arp2/3 qui sont requis pour la formation du piédestal (Goosney *et al.*, 2000a; Kalman *et al.*, 1999).

Aussi, les deux domaines terminaux devenus intracytoplasmiques (233 résidus en N-terminal et 217 en C-terminal) recrutent des protéines habituellement retrouvées dans les adhésions focales (focal adhesions) et pouvant lier l'actine, soit l'alpha-actinine, taline et vinculine (Freeman *et al.*, 2000). Cette liaison de Tir à ces protéines pourrait conférer un avantage aux EPEC en leur permettant de se tenir à la surface des cellules infectées et ainsi éviter l'action "entraînante" et "nettoyante" de la diarrhée (Freeman *et al.*, 2000).

Trois fonctions possibles ont été identifiées pour Tir : Premièrement, elle sert de récepteur à l'intimine pour permettre l'étape d'attachement intime. Sa deuxième fonction est d'aider à l'accumulation d'actine pour former le piédestal, après la liaison à l'intimine. Sa troisième fonction lui permettrait de transmettre certains signaux dans la cellule-hôte une fois que la liaison à l'intimine a été réalisée, comme par exemple, la phosphorylation de tyrosine chez la phospholipase C- $\gamma$ 1 (Kenny and Finlay, 1997).

Suite à des études *in vitro* où Tir était produit en quantité supérieure à la normale, il a été montré que les cellules-hôtes ne peuvent pas phosphoryler toute la population de Tir. Il y a trois possibilités : (i) l'activité kinase est limitée, (ii) il y a un équilibre phosphorylation-déphosphorylation ou (iii) la forme non-phosphorylée devient non-compatibles aux modifications si elle n'est pas modifiée immédiatement. Il semblerait qu'*in*



*vivo*, il y aurait une régulation de la translocation de Tir, possiblement par feed-back, suite à la liaison Tir-Intimine (Kenny and Warawa, 2001).

La sécrétion de Tir est associée à une protéine chaperon, CesT. Les 100 premiers acides aminés de Tir serviraient de domaine de liaison à CesT (Abe *et al.*, 1999).

Les souches O157:H7 utilisent différemment Tir dans le but de former le piédestal puisque dans leur cas, Tir n'est pas tyrosine phosphorylé (DeVinney *et al.*, 1999b). Chez les souches O157:H7, la tyrosine 474 est remplacée par une sérine, ainsi, les EHEC ne séquestrent pas Tir-phosphorylé dans le piédestal d'actine, mais ont plutôt développé un mécanisme alternatif, encore inconnu, pour arriver au même but (DeVinney *et al.*, 2001; Ismaili *et al.*, 1995; Kenny, 1999). Contrairement aux EPEC, la protéine de l'hôte Nck n'est pas impliquée dans la formation du piédestal (Gruenheid *et al.*, 2001). Malgré l'absence de tyrosine phosphorylation, N-WASP et le complexe Arp2/3 sont toujours recrutés au piédestal (Goosney *et al.*, 2001).

De plus, il semble que la formation du piédestal nécessite des facteurs supplémentaires encodés par les EHEC et sécrétés par le SSTT, puisqu'une souche EHEC  $\Delta tir$ , mais pas une souche EPEC  $\Delta tir$ , peut former un piédestal si elle est complétementée avec Tir<sub>EPEC</sub> où la tyrosine 474 a été remplacée par une phénylalanine (Y474F). Aussi, l'expression de Tir<sub>EHEC</sub> ou Tir<sub>EPEC</sub>Y474F dans une souche EPEC  $\Delta tir$  ne lui permet pas de former de piédestal. Le phénotype sauvage est retrouvé en co-infectant avec une souche EHEC  $\Delta tir$  et  $\Delta eae$  mais pas par une souche EHEC  $\Delta SSTT$  (DeVinney *et al.*, 2001). Ces facteurs additionnels pourraient servir d'interface entre Tir et le cytosquelette de l'hôte (DeVinney *et al.*, 2001). Il est intéressant de se demander pourquoi les EHEC auraient évolué de façon à utiliser un mécanisme différent de celui des EPEC pour former le piédestal. On peut penser que par leur mécanisme, les EHEC sont devenus des pathogènes plus efficaces car moins dépendant des processus de signalisation de l'hôte (par exemple les tyrosine kinases); (DeVinney *et al.*, 2001).

Il a déjà été démontré qu'il existe au moins cinq différents types d'intimine (Adu-Bobie *et al.*, 1998). Cette variation permet ainsi d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte. Pourtant, ces différentes variations pourraient avoir un rôle néfaste si des variations

compatibles ne se produisent pas non plus pour le récepteur Tir. L'équipe de Paton a comparé les séquences de *tir* pour différents sérotypes, autant EHEC que EPEC. Ils en sont venus à la conclusion qu'il existe une grande hétérogénéité pour les portions N-terminale et C-terminale. C'est la région centrale de Tir, où se trouve son domaine de liaison à l'intimine, qui est la mieux conservée (Paton *et al.*, 1998). Pour l'instant, il ne semble pas y avoir de corrélation entre les cinq types d'intimine et une variation de ce même type chez Tir.

### 5.9 Map (*orf19*)

La protéine Map (Mitochondrial associated protein) est encodée par l'*orf19* qui est situé directement en amont du gène *tir*. L'étude de la séquence de la protéine montre que celle-ci a des homologies avec TrcA/TrcP des EPEC et IpgB de *Shigella*. Map est transloquée par le système de sécrétion du type III, ce qui est surprenant puisque son homologue TrcA a une fonction de chaperon (Tobe *et al.*, 1999). La translocation de Map, comme celle de Tir, nécessite la présence de EspB. La microscopie à fluorescence a démontré qu'*in vitro*, Map se retrouve dans des structures ponctuelles du cytoplasme des cellules-hôtes, qui ont été identifiées comme des mitochondries. Le rôle de Map n'est pas encore connu. Map pourrait altérer les concentrations d'ATP/ADP dans le but d'affecter la fonction de canaux ATP-dépendants. Map pourrait aussi avoir une fonction anti-apoptotique en empêchant le relargage de facteurs proapoptotiques à partir des mitochondries (Kenny and Jepson, 2000).

### 5.10 Protéines chaperons

Les protéines chaperons du système de sécrétion du type III ne possèdent pas la capacité d'hydrolyser l'ATP et contrairement aux chaperonines, elles ne sont spécifiques qu'à une, ou très rarement deux, protéine(s) sécrétée(s). Il semble que les chaperons ne soient pas responsables du ciblage des protéines vers l'appareil de sécrétion (Wainwright and Kaper, 1998). Généralement, les chaperons du système de type III possèdent une fonction double : autant comme facteur anti-dégradation protéolytique que comme facteur anti-association (Abe *et al.*, 1999).

Malgré la faible identité de leur séquence d'acides aminés, les chaperons du système de sécrétion du type III partagent souvent plusieurs caractéristiques : une petite taille (14-19 kDa), un point isoélectrique (pI) acide (pH4-7) et une  $\alpha$ -hélice amphipathique en C-terminal (Cornelis *et al.*, 1998; Wainwright and Kaper, 1998; Wattiau *et al.*, 1996). Deux sous-familles ont été identifiées. La première comprend les chaperons qui n'ont qu'un seul substrat et qui le lient sur une région dans les 120 premiers résidus en N-terminal. Cette famille comprend SycE, SycH, SycT, SycN et YscB de *Yersinia*, SicP de *Salmonella* et CesT des EPEC (Bennett and Hughes, 2000). La deuxième famille contient les chaperons qui ont deux substrats et qui ne lient pas nécessairement le N-terminal, mais interagissent plutôt avec plusieurs sites sur leur substrat. SycD de *Yersinia*, CesD des EPEC, IpgC de *Shigella* et SicA de *Salmonella* font partie des chaperons bivalents (Delahay *et al.*, 2002).

#### 5.10.1 CesT

Tir possède un chaperon de 18 kDa (156 résidus), encodé par le gène *cesT* (orfU) qui se retrouve entre le gène de l'intimine et celui codant pour Tir (opéron LEE5); (Abe *et al.*, 1999; Elliott *et al.*, 1999a; Sanchez-SanMartin *et al.*, 2001). Un mutant  $\Delta cesT$ , causant l'absence du chaperon, affecte la capacité des EPEC à provoquer les réarrangements caractéristiques du cytosquelette, et inhibe la sécrétion et la translocation de Tir. La région de liaison à CesT (nommée CBD pour CesT-binding domain) se retrouve dans les 100 premiers résidus de Tir (Abe *et al.*, 1999). De plus, le C-terminal de CesT contient un motif d'hélice amphipathique qui joue un rôle dans l'interaction entre Tir et CesT. Cette interaction est nécessaire pour qu'il y ait sécrétion de Tir (Delahay *et al.*, 2002). Le motif d'hélice amphipathique est aussi retrouvé dans la partie C-terminale des chaperons Syc de *Yersinia* (Abe *et al.*, 1999; Woestyn *et al.*, 1996). Cette homologie permet de croire que CesT et les Syc auraient une fonction similaire. Les chaperons Syc serviraient de facteurs anti-association avec d'autres protéines (Woestyn *et al.*, 1996). Il a aussi été remarqué que lorsque le CBD était supprimé, la quantité de Tir retrouvé dans le cytoplasme diminuait, la même observation s'est produite chez les EPEC  $\Delta cesT$ . Ces résultats suggèrent que CesT aurait surtout un rôle de facteur anti-dégradation (Abe *et al.*, 1999).

CesT, en solution, forme des homodimères et son N-terminal est impliqué dans cette fonction de dimérisation (Delahay *et al.*, 2002; Luo *et al.*, 2001). Aussi, la région N-terminale de SicA de *Salmonella* est interchangeable avec celle de CesT, ce qui laisse croire que les deux sous-familles de chaperons emploient un même mécanisme de liaison chaperon-chaperon (Delahay *et al.*, 2002).

CesT et Tir formeraient un gros complexe de 180 kDa. La somme des poids moléculaires de CesT et Tir ne dépassant pas 90 kDa, on peut donc croire que le complexe serait multimérique. L'hypothèse est ainsi posée : CesT et Tir formeraient un complexe hexamérique de deux molécules de Tir pour quatre molécules de CesT. Ce gros complexe protégerait Tir des effets de la protéolyse jusqu'à ce que Tir soit sécrété. Puisque le complexe ne peut être détecté dans le surnageant de culture des EPEC, CesT se dissocierait du complexe juste avant la sécrétion de Tir (Abe *et al.*, 1999). Des études de cristallisation ont confirmé que le ratio Tir : CesT est de 1 : 2 (Luo *et al.*, 2001).

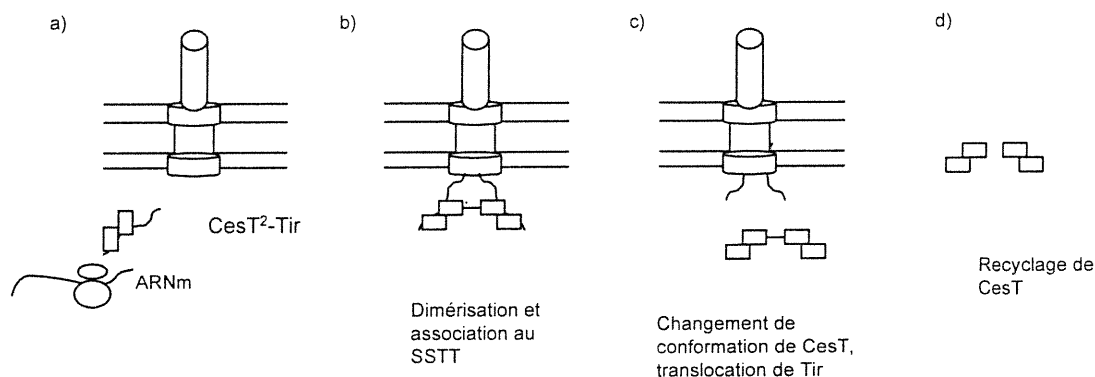


Figure 9 : Modèle du mécanisme d'action de CesT

Un modèle a été proposé : un dimère de CesT réagirait avec la chaîne polypeptidique naissante de Tir à la sortie du ribosome. Le complexe CesT-CesT-Tir interragerait ensuite directement avec le SSTT. Un deuxième complexe CesT-CesT-Tir s'associerait au premier, un échange d'hélice aurait lieu et le nouveau complexe CesT-Tir (4 : 2) serait prêt à être sécrété. Après le contact de la bactérie à l'entérocyte, Tir serait immédiatement sécrété. Après le relâchement de Tir, CesT reprendrait sa conformation "ouverte" qui éloigne le chaperon du SSTT et permet l'interaction avec d'autres molécules

de Tir ou avec d'autres facteurs comme des régulateurs de transcription (Isberg and Dumenil, 2001; Luo *et al.*, 2001).

### 5.10.2 CesD

CesD est encodé par un gène de 453 pb situé dans le LEE, dans le même opéron que *escC* et *escJ*. La protéine de 151 acides aminés (17,5 kDa) possède des homologies avec quelques protéines impliquées dans les SSTT, dont SicA de *Salmonella typhimurium* (identité de 25% et similarité de 48%), IpgC de *Shigella flexneri* (identité de 25% et similarité de 47%) et SycD de *Yersinia* (identité de 24% et similarité de 67%); (Menard *et al.*, 1994; Wattiau *et al.*, 1994).

CesD est nécessaire pour la sécrétion de EspD dans les surnageants de culture des EPEC. Aussi, un mutant  $\Delta cesD$  sécrète moins de EspB que la souche sauvage (de 10 à 13 fois moins). Pourtant, il a été démontré que CesD ne se lie qu'à EspD et non à EspB (Wainwright and Kaper, 1998). La portion N-terminale de CesD semble être nécessaire pour la liasons à EspD. En plus d'être retrouvée dans le cytoplasme de la bactérie, CesD a aussi été détectée en association avec la membrane interne, ce qui est unique chez les chaperons du type III (Wainwright and Kaper, 1998).

## 6. Autres facteurs de virulence

### **6.1 BipA**

La protéine BipA (ou TypA (Freestone *et al.*, 1998)) est une GTPase liant les ribosomes et qui a une homologie avec le facteur d'élongation G (EF-G) et avec la protéine de résistance à la tétracycline (TetO). Elle est aussi retrouvée chez *E. coli* K-12 et *Salmonella*, mais n'est phosphorylée sur les tyrosines que chez les EPEC. BipA est une protéine multifonctionnelle. Elle est premièrement impliquée dans les réarrangements du cytosquelette lors de la formation de lésions AE. *In vitro*, le mutant EPEC  $\Delta bip$  ne peut déclencher les réarrangements, même si la bactérie adhère à la cellule-hôte (cellules HeLa). D'un autre côté, l'infection des cellules HeLa avec un mutant surexprimant BipA restore la capacité à concentrer l'actine et induit la production de nombreux piédestaux. La zone

d'accumulation de l'actine est 40% plus vaste chez le mutant surexprimant BipA que chez la souche sauvage (Farris *et al.*, 1998).

Deuxièmement, il a été remarqué que l'expression de BipA chez *Salmonella* est induite lors d'une exposition de la bactérie au BPI (une protéine humaine antibactérienne produite par les granulocytes); (Qi *et al.*, 1995). Il a été démontré que la souche EPEC  $\Delta bipA$  est beaucoup plus sensible (de l'ordre de deux logs) au BPI que la souche sauvage. On peut en conclure que BipA confère une résistance à la protéine de défense de l'hôte, la BPI (Farris *et al.*, 1998).

Et troisièmement, BipA serait un régulateur négatif de la production de flagelline et de la motilité flagellaire de la bactérie. Le mutant EPEC  $\Delta bipA$  est significativement plus motile que la souche sauvage ou complémentée. La production de flagelline est 4 fois plus importante dans la souche  $\Delta BipA$  et presque 3 fois plus basse dans une souche surexprimant BipA, relativement à la souche sauvage. Le nombre de flagelles est aussi affecté puisque la souche mère possède en moyenne 1,4 flagelle par cellule tandis que la souche  $\Delta BipA$  en possède 2,5. Il faut noter qu'il est peu probable que l'on puisse expliquer l'augmentation de la motilité des cellules  $\Delta BipA$  seulement par une surexpression de la flagelline. Il faut donc présumer que d'autres composantes associées à la biosynthèse flagellaire soient aussi régulés par BipA (Farris *et al.*, 1998).

## 6.2 Etk

En 1999, Ilan et collaborateurs ont démontré que *E. coli* possède une tyrosine kinase localisée dans la membrane externe. En fait, toutes les souches de *E. coli* testées possèdent le gène *etk* (*E. coli* protein tyrosine kinase) mais seules les souches pathogènes (EPEC, ETEC et EHEC) expriment le gène pour produire la protéine. Aussi, il y a une homologie avec des protéines impliquées dans la production d'exopolysaccharides (EPS) qui sont requis pour la virulence, que ce soit pour la formation d'une capsule qui empêche la phagocytose ou pour un rôle dans l'attachement initial des bactéries à la cellule-hôte, comme chez *Erwinia amylovora* ou *Ralstonia solanacearum*. La corrélation entre la production de Etk et quelques souches incluant les EPEC, EHEC et ETEC suggère un certain rôle pour Etk dans la virulence de ces souches. Pourtant, des résultats préliminaires

semblent indiquer que la protéine ne serait pas impliquée dans la formation des lésions attachant-effaçant chez les EPEC (Ilan *et al.*, 1999). L'équipe a aussi démontré que la protéine peut phosphoryler, *in vitro*, un substrat exogène (un polymère de Glu:Tyr), ils ont donc émis l'hypothèse que la protéine BipA/TypA (Farris *et al.*, 1998; Freestone *et al.*, 1998) pourrait être le substrat spécifique de Etk, puisque BipA est phosphorylée sur les tyrosines, *in vitro*, par des extraits cellulaires de EPEC mais pas par des extraits de *E. coli* K-12 (Farris *et al.*, 1998).

### 6.3 BFP

Le BFP (bundle forming pilus) fait partie de la famille des pili de type IV qui sont retrouvés chez plusieurs organismes pathogènes. Ce sont des structures flexibles qui sont impliquées dans plusieurs procédés comme l'adhérence aux cellules épithéliales, l'autoaggrégation des bactéries, l'adsorption de bactériophages et la motilité saccadée (ou "twitching motility"). Le mécanisme de biosynthèse est peu connu. Généralement, les pili de type IV sont composés d'une sous-unité répétée, la piline, qui possède plusieurs caractéristiques distinctives. La piline possède une courte séquence signal chargée positivement qui est clivée par une pré-piline peptidase spécifique, le premier acide aminé de la protéine mature est N-méthylé, et la partie N-terminale de la protéine mature est caractérisée par une séquence de 30 acides aminés hydrophobes contenant un résidu glutamate situé toujours en position 5 (McNamara and Donnenberg, 2000). Le système de synthèse de pili de type IV contient aussi une protéine de la membrane externe qui appartient à une famille de protéines nommées sécrétines. Ces protéines s'assemblent en anneaux composés de 12 à 14 monomères et formeraient des canaux dans la membrane externe pour permettre aux sous-unités de piline de passer. D'autres protéines impliquées dans la biosynthèse ont été identifiées, mais leurs fonctions restent encore inconnues. Le système le plus étudié est celui retrouvé chez *Pseudomonas aeruginosa* (Anantha *et al.*, 2000). En plus du BFP, le gène *dsbA* est aussi nécessaire à l'adhérence localisée. DsbA est une enzyme périplasmique requise pour la formation de ponts disulfure.

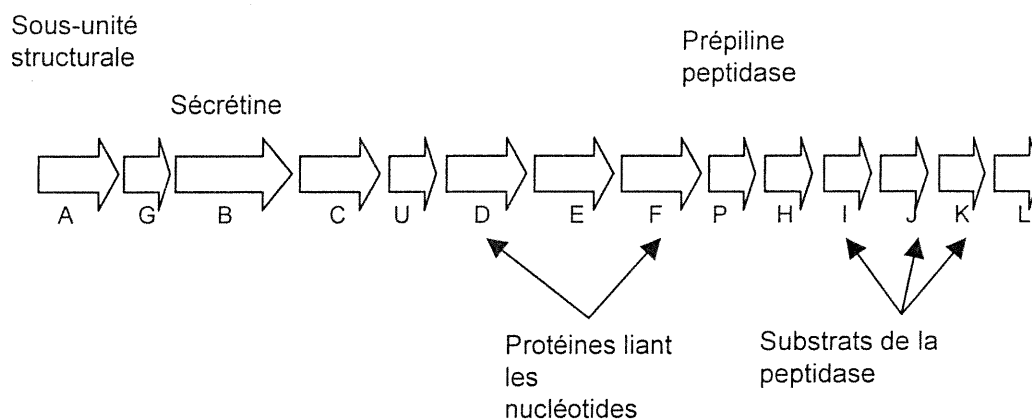


Figure 10 : Opéron BFP

Le BFP est encodé par un groupe de 14 gènes retrouvés dans un segment de 11,5 kb sur le plasmide EAF (EPEC adherence factor). En plus de ces gènes plasmidiques, la formation d'un pilus fonctionnel nécessite la présence de la protéine DsbA, une oxydo-réductase périplasmique requise pour la formation de ponts disulfures chez de nombreuses protéines, dont la sous-unité majeure du BFP (Kaper, 1994). Le BFP est très hydrophobe et est composé de plusieurs pili de 4 à 7 nm de diamètre qui sont arrangés latéralement pour former des amas (bundles) d'épaisseur variable (50-500 nm) et de longueur variable (15-20  $\mu\text{m}$ ); (Knutton *et al.*, 1999). Le gène *bfpA* encode la sous-unité majeure du pilus appelée prébundline. Le gène *bfpP* code pour la prépine peptidase qui clive la prébundline pour lui donner sa forme mature. Le gène *bfpB* code pour la lipoprotéine de la membrane externe. Le gène *bfpF* encode une protéine liant les nucléotides qui n'est pas requise pour la biosynthèse mais qui semble jouer un rôle dans l'autoaggrégation des bactéries via le BFP. D'autres gènes de l'opéron BFP encoderaient différentes protéines : BfpD, une autre protéine liant les nucléotides est requise pour la biosynthèse du pilus, BfpE ayant une homologie à PilC de *P. aeruginosa* et BfpH, une transglycosylase (Bieber *et al.*, 1998). L'opéron contient aussi des gènes encodant possiblement des substrats de la prépine peptidase, *bfpI*, *bfpJ* et *bfpK*. Les autres gènes de l'opéron, *bfpG*, *bfpC*, *bfpU* et *bfpL* ne montrent aucune homologie à des séquences connues.

L'expression du BFP n'est pas constitutive, elle est induite en phase exponentielle et est régulée par les signaux physico-chimiques caractéristiques du petit intestin (Bieber *et al.*, 1998). La transcription de *bfpA* est régulée par *perABC* (Frankel *et al.*, 1998).



Le BFP est responsable de l'attachement interbactérien et de la formation de microcolonies après la formation des lésions AE et ne serait pas impliqué dans l'adhésion à la cellule-hôte (Bieber *et al.*, 1998; Hicks *et al.*, 1998; Phillips, 1998). Le BFP demeure un important facteur de virulence puisque des souches mutantes pour le BFP ont une moins bonne capacité à causer la diarrhée chez des volontaires humains (Levine *et al.*, 1985).

## **7. PEPEC O45**

*E. coli* cause des diarrhées chez les porcs, de la naissance jusqu'à la période post-sevrage (Fairbrother, 1992). Les souches de sérotype O45 sont souvent impliquées dans des cas de diarrhée post-sevrage chez le porc, et des lésions AE ont été observées dans plusieurs de ces cas (Helie *et al.*, 1991). Il a été démontré que la plupart des isolats porcins de sérotype O45 examinés sont capables d'induire la formation de lésions AE *in vitro* et *in vivo*, et que ces lésions sont similaires à celles retrouvées dans des cas d'infections naturelles et dans le cas d'infections à EPEC chez l'humain (Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995b). Les souches O45 porcines ayant la capacité d'induire la formation de lésions AE ont été désignées PEPEC pour "porcine enteropathogenic *E. coli*" (An *et al.*, 2000).

### **7.1 Les facteurs de virulence**

La caractérisation phénotypique et génotypique des souches PEPEC a démontré que ces souches ne possèdent pas de facteurs de virulence associés aux souches ETEC (Zhu *et al.*, 1994). Elles ne produisent généralement pas de vérotoxine ni d'entérotoxines (Zhu *et al.*, 1994). Pourtant, la plupart des isolats PEPEC possèdent une séquence nucléotidique homologue au gène *eae* (Beaudry *et al.*, 1996). Les PEPEC O45 ne possèdent pas le BFP, c'est la différence majeure avec les EPEC humains (Zhu *et al.*, 1994). Une analyse des plasmides a révélé que les souches PEPEC contiennent plusieurs plasmides de haut poids moléculaire et de faible poids moléculaire. Certains de ces plasmides ont une homologie de séquence avec le plasmide pHS2, un plasmide de 3 kb provenant de *Shigella flexneri* (Beaudry, 1995).

### 7.1.1 LEE

Il y a une corrélation entre la présence du LEE et le phénotype AE chez les PEPEC O45. Le site d'insertion du LEE varie chez les différentes souches. Chez les souches EPEC E2348/69 et EHEC EDL933, le LEE est inséré dans le locus *selC* encodant l'ARNt de la sélénocystéine (McDaniel *et al.*, 1995; Perna *et al.*, 1998). Pour certaines souches PEPEC O45, le site d'insertion du LEE est identique à celui des souches E2348/69 et EDL933, mais plusieurs autres souches O45 possèdent des LEE pour lequel le site d'insertion a divergé (soit la jonction droite ou la jonction gauche) pendant l'évolution ou est localisé ailleurs. Chez la souche 86-1390, seule la jonction droite de l'îlot de pathogénicité est insérée dans le locus *selC*, ce qui suggère que la jonction gauche a été éliminée ou a divergé pendant l'évolution (An *et al.*, 2000).

### 7.1.2 Les Esp et Tir

La souche 86-1390 possède les gènes *espADB* et *tir* et les protéines encodés par ceux si sont homologues à celles des autres AEEC (voir tableau II); (An *et al.*, 2000).

Tableau II : Comparaison des séquences protéiques entre la souche PEPEC 86-1390 (sérotype O45) et autres AEEC

	Tir	Intimine	EspA	EspD	EspB
RDEC-1 (REPEC)	98,9%	98,8%	97,9%	100%	99,0%
E2349/69 (EPEC)	64,5%	84,5%	88,0%	87,1%	69,3%
EDL933 (EHEC)	65,5%	81,6%	84,4%	73,7%	70,4%

### 7.1.3 L'intimine

Les PEPEC possèdent dans leur membrane externe une protéine de 97 kDa. Son poids moléculaire, la séquence en acides aminés de sa partie N-terminale, de même que sa similarité antigénique ont permis de conclure qu'il s'agit bien de l'intimine (Zhu *et al.*, 1995a). Elle fait partie du sous-groupe d'intimine  $\beta$  (An *et al.*, 2000). De plus, la séquence protéique est clivée au niveau du 40<sup>e</sup> acide aminé comme c'est le cas pour l'intimine des souches humaines EPEC et EHEC (Zhu *et al.*, 1995a). Les souches O45 expriment des intimines antigéniquement similaires entre elles mais aussi avec celle de la souche de lapin

RDEC-1 qui possède aussi une intimine  $\beta$  (Agin and Wolf, 1997; An *et al.*, 2000; Zhu *et al.*, 1995a). À l'inverse, l'intimine des PEPEC partage moins de similarité avec celle des EPEC (Zhu *et al.*, 1995a; Zhu *et al.*, 1996). Il existe une corrélation entre la quantité d'intimine exprimée et la sévérité des lésions AE induites par les PEPEC *in vivo* (Zhu *et al.*, 1995a).

#### 7.1.4 L'adhérence

La plupart des isolats PEPEC *eae+* isolés de cas de diarrhée post-sevrage induisent des lésions AE, bien qu'ils ne produisent pas de BFP, et qu'ils ne montrent pas d'adhérence localisée contrairement aux EPEC (Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995b). Il est possible que les PEPEC possèdent des fimbriae ou des facteurs d'adhérence fonctionnellement similaires au BFP, mais que ceux-ci ne reconnaissent pas de récepteurs potentiels sur les lignées cellulaires telles que les cellules HEp-2, d'où le résultat négatif dans le test FAS (fluorescence actin staining); (Zhu *et al.*, 1996). Ces fimbriae ou facteurs d'adhérence spécifiques à certains récepteurs propres aux entérocytes de porcs pourraient être impliqués dans l'adhérence initiale des PEPEC, et ainsi permettre l'adhérence intime et l'effacement des microvillosités (Beaudry *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1994).

#### **7.2 Modèle *ex vivo***

Un modèle *ex vivo* utilisant des explants d'iléons de porcelets nouveau-nés a été développé afin d'étudier l'apparition des lésions AE par les PEPEC. Ce modèle a permis de détecter l'adhérence intime des bactéries, l'effacement des microvillosités et des structures en piédestal. Le modèle a permis de démontrer que la majorité (88%) des souches PEPEC O45 *eae+* examinées induisent des lésions AE, tandis qu'aucun isolat *eae* négatif n'en a induit (Zhu *et al.*, 1995b). De plus, certains isolats PEPEC *eae*-positifs démontrent plus de virulence que d'autres, suggérant une variation dans l'expression des divers facteurs de virulence associés à la formation de lésions AE ou l'implication d'autres facteurs de virulence encore inconnus mais présents dans certaines souches (Zhu *et al.*, 1994).

## **8. Paa**

Dans le but de découvrir d'autres facteurs nécessaires à la formation d'une lésion AE, une banque de mutants *TnphoA* a été créée dans la souche PEPEC 86-1390. Cette dernière souche fait partie du sérogroupe O45. La sélection des mutants a été faite en fonction de la perte de leur capacité à causer des lésions AE. Plusieurs mutants ont été observés dont certains étaient déjà connus et il a été possible d'identifier un nouveau locus génétique qui a été nommé Paa pour "Porcine AE Associated gene". Le mutant  $\Delta paa$  (M155) montre une incapacité à induire des lésions AE, *in vitro*, en comparaison avec la souche sauvage ou le mutant complémenté (M155c).

Le gène *paa* possède 753 pb avec un contenu en G +C de 44%. La protéine déduite aurait 251 acides aminés, pour un poids moléculaire de 27,6 kDa. Paa possède une identité de 50% avec AcfC, un facteur de colonisation accessoire chez *Vibrio cholerae*. Sa séquence nucléotidique est répertoriée dans Genbank sous le numéro d'accès U82533 (*paa* portait auparavant le nom de *anm*); (An, 1998).

Pour connaître l'importance de *paa*, une étude de la distribution de *paa* chez *E. coli* entérique a été faite. La relation entre la présence de *paa* et celle de *eae* a été étudiée chez des isolats humains et animaux. On sait que le gène *eae* est nécessaire à la formation de lésions AE. En général, on peut voir que *paa* est retrouvé chez 74% des souches *eae* positives. Plus précisément, la corrélation entre la présence de *paa* et *eae* est de 100% chez EHEC O157:H7, et un peu moins chez DEPEC, REPEC, PEPEC et chez les EPEC humains (An *et al.*, 1999).

Tableau III : Corrélation entre la présence de *eae* et *paa* chez des isolats humains et animaux de *E. coli*. Tiré de (An *et al.*, 1999)

		Nombre d'isolats <sup>a</sup>			
		Total	<i>eae</i>	<i>paa</i>	<i>eae/paa</i>
Humain	EHEC <sup>b</sup>	16	16	16	100%
	EPEC <sup>c</sup>	5	5	2	20%
Lapin		19	19	13	68%
Chien		23	15	13	87%
Porc	O45	33	24 <sup>d</sup>	15	63%
	Autres	151	0	0	0%

<sup>a</sup> Les isolats sont négatifs pour VT, STa, STb, et LT sauf pour les isolats EHEC qui sont positifs pour VT

<sup>b</sup> Sérogroupes O157 et O26

<sup>c</sup> Sérogroupes O26, O111, O55 et O18

<sup>d</sup> Sur 24 souches, 21 ont la capacité de causer des lésions AE *ex vivo* et *in vivo* (Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995b)

Aussi, des séquences homologues à *paa* ont été retrouvées chez les souches ETEC chez le porc et dans ces souches, il y a une corrélation entre la présence de *paa* et des gènes encodant la LT (An *et al.*, 1999).

Lors de travaux précédants, le site d'insertion du LEE a été étudié ainsi que la corrélation entre *paa* et la formation de lésions AE. On peut voir que la présence de *paa* est associée à la formation des lésions AE par les souches PEPEC O45 *eae+* tandis que l'absence du gène, dans les souches O45 *eae+* mène à une inhibition ou à un retard dans la formation des lésions (An, 1998).

## **SECTION II: Méthodologie et Résultats**

**Article:**  
**Characterization of the novel Paa factor involved in the early steps of the  
attaching and effacing *E. coli* mechanism**

Soumis à Molecular Microbiology

Ma contribution à cet article concerne une partie de la rédaction et de la correction du manuscrit. J'ai participé aux procédures expérimentales en produisant les constructions ayant servi à créer une mutation non-polaire dans *paa* par échange allélique, en localisant *paa* dans le chromosome autant par une étude bioinformatique que par des réactions de PCR, en faisant de l'électrophorèse à champs pulsés (PFGE), et en procédant à diverses études bioinformatiques pour la caractérisation de la protéine.

**Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the attaching and effacing *E. coli* mechanism**

Isabelle Batisson<sup>1</sup>, Marie-Pierre Guimond<sup>1</sup>, Francis Girard<sup>1</sup>, Hongyan An<sup>1</sup>, Chengru Zhu<sup>1</sup>, Eric Oswald<sup>2</sup>, John M. Fairbrother<sup>1</sup>, Mario Jacques<sup>1</sup> and Josée Harel<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada

<sup>2</sup>Unité INRA-ENVT de Microbiologie Moléculaire, École Vétérinaire de Toulouse, 31076 Toulouse Cedex, France

\* Corresponding author: Josée Harel

Telephone: (450) 773-8521 ext. 8233

Fax: (450) 778-8108

Email: [harelj@MEDVET.UMontreal.CA](mailto:harelj@MEDVET.UMontreal.CA)

**Running title:** Paa, a novel factor involved in adhesion mechanism of AEEC.

**Keywords:** Porcine A/E *E. coli*, *TnphoA* mutagenesis, *in vitro* ileal explant, *paa* (porcine A/E associated gene).



### **Abstract**

Non-enterotoxigenic porcine *E. coli* strains belonging to the serogroup O45 have been associated with postweaning diarrhoea in swine and adhere to intestinal epithelial cells in a characteristic attaching and effacing (A/E) pattern. O45 porcine enteropathogenic *E. coli* (PEPEC) strain 86-1390 induces typical A/E lesions in a pig ileal explant model. Using *TnphoA* transposon insertion mutagenesis on strain 86-1390, we found a mutant that was unable to induce A/E lesions. The insertion was identified in a gene designated *paa* (porcine attaching-effacing associated gene). Sequence analysis of *paa* revealed an open reading frame of 753 bp encoding a 27.6 kDa protein which displayed 100%, 51.8% and 49% homology with Paa of EHEC O157:H7 (EDL933 and Sakai), PEB3 of *Campylobacter jejuni* and AcfC of *Vibrio cholerae*, respectively. Chromosomal localisation studies indicated that the region containing *paa* was inserted between the *yciD* and *yciE* genes at about 28.3 min. of the *E. coli* K12 chromosome. The presence of *paa* and *eae* sequences in the porcine O45 strain is highly correlated with the A/E phenotypes. However, the observation that three *eae* positive but *paa* negative PEPEC O45 strains were A/E negative provides further evidence for the importance of the *paa* gene in the A/E activity of O45 strains. As well, the complementation of the *paa* mutant restored A/E activity of the 86-1390 strain showing the involvement of Paa in PEPEC pathogenicity. These observations suggest that Paa contributes to the early stages of AEEC virulence.

## Introduction

Attaching and effacing *E. coli* (AEEC) induces distinctive histopathological lesions on the intestinal mucosa, known as the attaching and effacing (A/E) lesions. These lesions are characteristic of enteric pathogens as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) responsible of severe childhood diarrhoea in the developing countries (Fagundes-Neto, 1996; Nataro and Kaper, 1998), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) causing haemorrhagic colitis and haemolytic uraemic syndrome (HUS), a diarrheoagenic *E. coli* strain of rabbits (RDEC-1), strains of *Hafnia alvei* isolated from children with diarrhoea and *Citrobacter rodentium*, causing transmissible colonic hyperplasia in mice (Baldwin *et al.*, 1991; Francis *et al.*, 1986; Tzipori *et al.*, 1989). A/E lesions have also been associated with diarrhoea in different animal species such as rabbits, calves, dogs, cats, lambs, pigs and Tamarins (Broes *et al.*, 1988; Cantey and Blake, 1977; Janke *et al.*, 1989; Moxley and Francis, 1986; Zhu *et al.*, 1994, Mansfield, 2001 #53).

A/E lesions results from the intimate bacterial adherence to the apical surface of the enterocytes and activation of several chromosomal gene products that interact with components of the host cell, leading to host cell proteins phosphorylation, effacement of target brush borders and disruption of the underlying actin cytoskeleton (Donnenberg and Kaper, 1992; Nataro and Kaper, 1998). These genes are clustered in a chromosomal pathogenicity island called the locus of enterocyte effacement (LEE). Its location and size vary within the various strains. In EPEC strain E2348/69 and EHEC O157:H7 strains the LEE is inserted in the *selC* locus at about 82 minutes on the *E. coli* K12 chromosome but its size varies from 35 kb for EPEC to 43 kb for EHEC. In strains of serotype O26:H-, the LEE is about 35 kb and is inserted in the *pheU* gene (Elliott *et al.*, 1998; McDaniel and Kaper, 1997; Sperandio *et al.*, 1998). One of these genes (*eae*) encodes intimin, a 94 kDa outer membrane protein involved in intimate attachment to host cells (Jerse *et al.*, 1990). Another encodes a translocated intimin receptor called Tir which interacts with intimin and allows the intimate attachment of the bacteria to the epithelial cells (Kenny *et al.*, 1997). Other genes encode the secreted proteins EspA, EspB, EspD and EspF, which are responsible for signal transduction in epithelial cells (Foubister *et al.*, 1994; Jarvis *et al.*,

1995; Kenny *et al.*, 1996; Knutton *et al.*, 1987; Lai *et al.*, 1997; McDaniel *et al.*, 1995; McNamara *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 1998) and are secreted through a type III secretion apparatus, the latter also being encoded in the LEE (McDaniel *et al.*, 1995). EspA is the major component of a large transiently expressed filamentous surface appendage bridging bacterial and host cell surfaces and is required for translocation of the effector molecules Tir, EspD, EspB and EspF into eukaryotic cells (Knutton *et al.*, 1998; McNamara and Donnenberg, 1998). EspD protein is essential for the formation of EspA-containing appendages and is transferred to the cytoplasm and integrated into the cytoplasmic membranes of infected cells where it might form a translocation pore with EspB. Together with EspA, these two proteins are thought to constitute a molecular syringe, channelling other effector proteins into the host cell. EspB and EspD interact with each other *in vitro* and would constitute the tip of the needle, forming a pore into target cell membranes, which might represent the type III secretion translocon (Kresse *et al.*, 1999; Wachter *et al.*, 1999). Moreover, the putative structural needle protein, EscF, sharing sequence similarity with the main components of the needle type III secretion complex MxiH (*Shigella*) and PrgI (*Salmonella*), is required for type III protein secretion and EspA filament assembly (Daniell *et al.*, 2001; Wilson *et al.*, 2001). EspA can bind directly to EscF, suggesting that EspA filaments are an expansion of the type III secretion needle complexes in EPEC. EspF is required for the loss of transepithelial electrical resistance, for increased monolayer permeability, and for redistribution of tight junction-associated protein occludin (McNamara *et al.*, 2001). The recently identified EspC enterotoxin located within a second pathogenicity island at 60 min. on the chromosome of *E. coli* may also play a role as an accessory virulence factor in some EPEC (Mellies *et al.*, 2001).

A/E lesions in naturally occurring swine post-weaning diarrhoea cases are often associated with *E. coli* of the O45 serogroup (Harel *et al.*, 1991; Helie *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1994). These pigs AEEC, termed PEPEC, possess all the genes encoded by the LEE. The A/E activity of the PEPEC O45 isolates is highly correlated with the presence of the LEE (Helie *et al.*, 1991; Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995). Although there is some heterogeneity in PEPEC strains with respect to the LEE insertion, all of these strains possess a  $\beta$ -intimin subtype. In PEPEC strain 86-1390, sequences of the *eae*, *tir* and *esp*

regions are closely related to those of other AEEC, particularly with rabbit EPEC (REPEC) strains (An *et al.*, 2000). The presence of *eae* $\beta$  variant gene in the O45 86-1390 porcine strain (Zhu *et al.*, 1996) is associated with the ability of this strain to produce A/E lesions in experimentally inoculated newborn gnotobiotic piglets (Zhu *et al.*, 1994) and in an homologous *in vitro* model using newborn piglet ileal explants (Zhu *et al.*, 1995). We have created a bank of *TnphoA* mutants in PEPEC strain 86-1390 and screened for the loss of their capacity to induce the typical histopathological A/E lesions in pig intestinal ileal explants (An *et al.*, 1999). One mutant, M155, did not induce A/E lesions, the *TnphoA* insertion occurring in a gene that was called *paa*, for porcine A/E associated. The distribution of *paa* in PEPEC O45 strains revealed that it was associated with presence of the *eae* gene and its A/E phenotype *in vivo*. On examination of enteric *E. coli* isolates from humans and various animal species, a strong correlation with the presence of *paa* was found in EHEC O157:H7 and O26, and dog, rabbit and pig *eae*-positive isolates, and to a lesser extent in human EPEC *eae*-positive isolates (An *et al.*, 1999). The aim of this study was to characterize the *paa* gene and to study the contribution of Paa to the development of PEPEC A/E lesions in a pig ileal explant model.

## **Results**

### **Identification of a transposon mutant deficient in attaching and effacing activity**

After random insertion of *TnphoA* into the genome of porcine O45 *E. coli* strain 86-1390, mutants containing translational fusions between bacterial genes for extracytoplasmic proteins and *phoA* were screened on LB agar supplemented with Km, Sm and with substrate XP. A total of 180 *TnphoA* mutants were then examined in a qualitative assay for adhesion to piglet ileal explants (Zhu *et al.*, 1995). A total of 175 isolates were found to attach extensively to piglet ileal enterocytes as observed by light microscopy (An *et al.*, 1999). In the five mutants impaired for the colonization ability, different insertion sites of the *TnphoA* were observed. Three were in genes found in *E. coli* K12 (*osmB*, two in *pstS*), there was also an insertion in *IS100*, and mutant M155. Hence, only this mutant was retained for further characterization. The presence of a single copy of *TnphoA* in the chromosomal DNA of the mutant M155, was demonstrated using Southern hybridisation of genomic DNA digested by *SacI* or *EcoRV* and probed with an internal *BamHI-HindIII* fragment of *TnphoA* (data not shown).

### **Effect of the Paa mutation and the complementation on the adherence phenotype**

The insertion of *TnphoA* in the *paa* gene (M155 mutant) resulted in a markedly reduced number of ileal villi showing bacterial adherence to epithelial intestinal cells, as compared to that observed for the wild type 86-1390, in our explant culture model (Fig. 1a). Furthermore, the complementation of strain M155 with the pACYC184 plasmid carrying the *paa* gene and its promoter region (M155c strain) restored the adherence phenotype. In addition to these results, the observation by transmission electron microscopy (TEM) showed difference between the M155 mutant strain, its complemented mutant strain M155c and the wild type 86-1390 strain (Fig. 2). On TEM, M155 mutant shows no evidence of A/E lesions formation (Fig. 2a), whereas the M155c and 86-1390 strains show bacteria tightly attached to epithelial cell surfaces, effacement of microvilli beneath the adherence site, and a dark region underneath the adherence site representing F-actin polymerisation (Fig. 2b). No bacterial attachment and no A/E lesions were seen for negative control strain 862 on light microscopy (LM) and TEM (Data not shown).

### Sequence analysis of *paa* and associated loci

To further characterize the locus around the site of the *TnphoA* insertion of mutant M155, a genomic DNA library of PEPEC strain 86-1390 was screened. On primary screening, several of the plaques hybridised to the 350 bp PCR fragment which corresponded to the sequence adjacent to the *TnphoA* insertion of mutant M155 and had been radiolabeled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]CTP. One of these, with an insert of 6 kbp and designated  $\lambda$ ZAPII<sup>R</sup> AN1, was chosen for further study. Using primers obtained from the sequence adjacent to the *TnphoA* insertion in M155, we determined the nucleotide sequence of the full length of the gene where *TnphoA* was inserted. This gene was called *paa*. The complete nucleotide sequence was lodged with GenBank under accession number U82533 (*paa* was previously named *anm*). It revealed an open reading frame (ORF) of 753 bp. The region upstream of the first ATG was preceded by excellent matches to consensus sequences for -35 and -10 putative promoter regions and by a Shine Dalgarno sequence (Fig.3). Downstream of the TAG translational stop codon, a putative transcription terminator was evident (Fig. 3). The G+C content of *paa* was 44%, which is substantially lower than that of *E. coli* K-12 (50.8%), (Blattner *et al.*, 1997) suggesting that *paa* may have been acquired by 86-1390 through horizontal transfer. *paa* was predicted to encode a 251 amino-acid protein with an anticipated molecular mass of 27.6 kDa (Fig. 3). The prediction of the Paa protein localisation site using the Expasy software suggested that the Paa peptide may be cleaved after the first 18 residues (von Heijne, 1986) (Fig. 3). The hydrophobicity profile indicated the presence of a potential transmembrane region (amino acids 1 to 18) corresponding to a Sec-dependent signal sequence, and hydrophilic segments in mature Paa. However, the Expasy program also predicted that the entire Paa protein could be unstable due to its N-terminal end. The Domain Architecture Retrieval Tool (DART) in NCBI identified a sulphate-binding motif in the C-terminal half of the protein. Paa was compared with other proteins in the SWISS-PROT database. The amino-acid sequence of *paa* gene displayed an identity of 100% with the *paa* gene of the O157:H7 EDL933 and Sakai strains, 51.8% with PEB3, a major antigen of *Campylobacter jejuni* and 49% with AcfC, a gene product of the *Vibrio cholerae* accessory colonization factor (Fig. 4). AcfC and PEB3 also contains the same sulphate-binding motif.

### Localisation of *paa* on the chromosome

The 3.5 kb region containing *paa* was also 100% identical to the same region in the O157:H7 EDL933 and Sakai strains. Upstream of *paa*, there was an homology with the *prpH* gene encoding a fimbrial protein precursor of Pap-related pilus H. Downstream of *paa*, was a sequence displaying identity to the *rem* gene from *E. coli* K-12. This may indicate that *paa* has interrupted the *relB-rem* region, and indeed the *relB-rem* region of many *paa* positive strains is disrupted, as demonstrated by the finding that the *relB-rem* region of these strains could not be amplified by PCR (not shown). On the other hand amplification was successful when using a set of *paa-rem* primers. Localisation of *paa* in the genome of O157:H7 strains EDL 933 and Sakai demonstrated that *paa* was inserted at 28.3 minutes within the *yciD-yciE* locus of the K-12 chromosome. PCR studies confirmed this result: nine of fourteen (64%) EPEC strains isolated from pigs, two of seven (29%) REPEC strains and three of four human EHEC strains (75%) were interrupted in the region between the *yciD* and *yciE* genes from *E. coli* K-12 (Table1). Thus, in the O157:H7 strains EDL933 and Sakai *paa* belongs to O-island #57 or to Sp9 region respectively, inserted within *yciD* and *yciE*. These islands contain incomplete lambda-like phage sequences (phage CP-9330 for EDL933, phage Sp9 for Sakai). In PEPEC strains, the *paa* region is also within *yciD-yciE*. Moreover, in these genomes the *relB-rem* region is disturbed and a copy of *rem* is found near the 3'end of *paa*. Genome analysis of the two studied O157:H7 strains indicates that *paa* is in a region specific to these pathogenic strains, which harbours the sequence of a lambda phage.

The chromosome of different AEEC strains was digested with *SfiI* or *XbaI* and examined by pulsed field electrophoresis and Southern blot. For each of the two digests, a *paa* biotinylated probe hybridised with only one fragment of about 210 kbp (*XbaI*) or 120 kbp (*SfiI*) for strains 86-1390 and M155 and about 290 kbp (*XbaI*) or 210 kbp (*SfiI*) for EHEC O157:H7 STJ348 strain indicating different chromosomal arrangement in this latter strain with respect to the two former strains. There was no hybridisation for the EPEC strain E2348/69 suggesting that *paa* is absent in this strain. The absence of *paa* gene in this strain was confirmed by PCR analysis. In *paa* positive strains, *paa* was present in only one copy in the chromosome.

### **Creation of a *paa* mutant by allelic exchange and complementation**

Creation of a *paa* mutant by allelic exchange on the chromosome of PEPEC strain 86-1390 was unsuccessful. However, a *paa* mutant (E22 $\Delta$ *paa*) was obtained from strain E22, a *paa* positive REPEC strain that induces A/E lesions in our porcine *ex vivo* model. Strain E22  $\Delta$ *paa* showed a reduced adherence phenotype (Fig. 1b), and was not able to induce A/E lesions in the *ex vivo* model. The complementation of E22  $\Delta$ *paa* with the wild-type *paa* restored this phenotype (Fig 1b).

### **Development of A/E lesions *in vivo* by *paa* positive and negative PEPEC strains**

All tested *eae*-positive porcine O45 isolates induced A/E lesions leading to diarrhoea appearing from 24 to 96 hours (Table 2). The severity and extent of the A/E lesions appeared to be related to the time of onset and severity of diarrhoea in the inoculated piglets. Among strains inducing no A/E lesions, some piglets however developed mild diarrhoea after 72h p.i. For the isolate 82-4378, scattered focal lesions were observed although inoculated piglets were clinically normal at 120h p.i. We also observed that all the strains leading to delayed diarrhoea (after 70 h p.i.) or to no diarrhoea were defective for the *paa* gene suggesting a role of *paa* in the initial step of adherence of the bacteria.

### **Capacity of anti-Paa antibodies to block adhesion**

Treatment with chicken egg yolk anti-Paa antibodies significantly reduced the percentage of intact villi showing intimate adherence, by up to 53 %, following inoculation of pig ileal explants with PEPEC strain 86-1390 *ex vivo* (Fig 5), when both compared to T(—) treatment, which consisted of lyophilized egg yolk antibodies from hens immunized with a sonicate preparation from host strain M15 (pREP4).



## Discussion

In this study, we have identified a locus important for A/E lesions that we named *paa*, by transposon mutagenesis using a PEPEC strain. The mutant *paa::TnphoA* was no longer able to adhere to microvilli of intestinal epithelial cells and to create A/E lesions. *paa* sequences are often present in A/E strains especially O157:H7 strains. The predicted amino acid sequence of Paa is identical to that of the Paa of O157:H7 strain EDL933 and Sakai (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001) and very similar to that of the PEB3 and AcfC proteins. PEB3 is a major surface antigen involved in the pathogenicity of *Campylobacter jejuni* and was shown to be very unstable at ambient temperature. This feature is also shared with Paa. AcfC is part of the TCP *acf* gene cluster which has previously been shown to be required for efficient intestinal colonization and biogenesis of toxin-associated pilus of *Vibrio cholerae* (Peterson and Mekalanos, 1988). Genomic analysis of numerous *V. cholerae* strains (O1, non-O1 and O139) revealed that only vibrios capable of causing epidemic Asiatic cholera possessed the TCP-ACF colonization gene cluster (Kovach *et al.*, 1996). AcfC is possibly secreted by *V. cholerae* cells into the culture supernatant (Everiss *et al.*, 1994). It is not known if Paa plays a role similar to that of AcfC. Paa, in contrast to AcfC, was shown to be associated mostly with the bacterial pellet and was best expressed in LB broth at 30°C (data not shown). Nevertheless, the *paa* gene encodes a protein involved in the mechanism of pathogenesis of strain 86-1390. This gene is absent in non-pathogenic *E. coli*, and the G+C content of *paa* (44%) differs from that of K12 *E. coli* (50.8%).

The regions flanking *paa* in PEPEC 86-1390 were sequenced for a total of 3.5 kb. Upstream of *paa* there is a truncated gene homologous to *prpH*, coding for a subunit of the H pilus, a member of the Pap family, and downstream of *paa* are two genes homologous to *gef* and *rem*. The *gef* gene encodes a putative toxic protein similar to the Hok/Gef family and *rem* has no known function. This region containing *paa* in the 86-1390 strain is 100% identical to the region containing *paa* in the O157:H7 strains EDL933 and Sakai. In the Sakai strain, this region is enclosed in a region of 58.2 kb, specific to the pathogen, localized between *yciD* and *yciE* of *E. coli* K12 MG1655. This 58.2 kb region contains a

lambda prophage that harbours virulence-related genes encoding proteins such as Lom and TrcA homologues. Lom is a member of a family of outer membrane proteins associated with virulence in two enterobacterial species. Expressed in lysogens, this protein confers the ability to survive in macrophages (Barondess and Beckwith, 1990). TrcA is reported to be a chaperone molecule in EPEC strains (Tobe *et al.*, 1999). The prophage contains insertions of IS elements and deletions, and thus is presumably defective (Ohnishi *et al.*, 2001). In strain EDL933, the region containing *paa* is inserted in a larger region of 103.1 kb, also localized between *yciD* and *yciE*. We can suppose that these flanking sequences are also found in the PEPEC 86-1390 strain. These data suggest *paa* could be part of a new putative pathogenicity islet.

The distribution of *paa* in PEPEC O45 strains revealed that it was associated with the presence of *eae* and the A/E phenotype *in vivo* and *in vitro* (An *et al.*, 1999). The correlation between the presence of *paa* and *eae* among the isolates from humans and animals suggests that *paa* may have a more important role in the A/E activity of EHEC and dog isolates than in the A/E activity of rabbit, pig O45, and human EPEC isolates (An *et al.*, 1999). The presence of the *paa* gene could reflect some differences in the mechanisms of A/E activity and/or the development of diarrhoea in isolates from different animal species and categories such as EHEC and EPEC. The explant culture technique has proved to be an efficient way to study the A/E phenotype *ex vivo* (Zhu *et al.*, 1995). Moreover, use of ileal explants from the same animal species as that from which the isolates originated eliminates problems due to poor recognition of species-species receptors by bacterial adhesins. The observation that three *eae* positive but *paa* negative porcine O45 strains were A/E negative provides further evidence for the importance of the *paa* gene in the A/E activity of porcine O45 strains. These results are confirmed by demonstration in the *ex vivo* model of a clear decrease in the number of ileal villi showing bacterial intimate adherence for *paa* mutants as compared to their wild type PEPEC and REPEC strains. Complementation of the mutants with the *paa* gene restored adherence capacity to a level similar as that of the wild type strain (Fig. 1) confirming the importance of *paa* in PEPEC O45 strain 86-1390 and REPEC. However, we observed that the growth rate of strain M155 complemented with the high copy number plasmid pCRII carrying the *paa* gene and its

promoter sequence was lower than that of M155 complemented with *paa* carried by the low copy number plasmid pACYC184. This suggests that the *paa* gene product may be toxic in the wild type *E. coli* strain. Moreover, the ability of Paa-specific antibodies to reduce the adherence level of the PEPEC strain 86-1390 clearly demonstrates the involvement of Paa protein in the early stages of AE lesion formation, probably in the initial adherence process. These results indicate that Paa protein could be a potential candidate for a vaccine, together with Eae and Tir.

Interestingly, Paa contains a sulphate-binding domain, such motifs also being associated with microbial adherence. For instance, numerous pathogens such as *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* or *Pseudomonas aeruginosa* bind to the host cell surface via heparan-sulphate (HS). Gram positive bacteria, viruses and parasites also bind HS on host cells (Plotkowski *et al.*, 2001; Rostand and Esko, 1997). Furthermore, infection studies in gnotobiotic piglets also demonstrated that the Paa protein is involved in the first step of PEPEC pathogenicity, particularly in the initial bacterial adherence, since *paa* defective strains showed a reduced adherence and no or a delayed onset of diarrhoea. All this data indicates that Paa contributes to the intimate-adherence phenotype and might be a new adhesin. Its receptor could be heparan-sulphate as with other pathogens. The more precise role of *paa*, which is associated not only with AEEC but also with some pig enterotoxigenic *E. coli* (An *et al.*, 1999), is under investigation.

## Experimental procedures

### **Bacterial strains and plasmids**

The wild type pathogenic *E. coli* strain 86-1390 (serogroup O45, tetracycline (Tc<sup>R</sup>), and streptomycin (Sm<sup>R</sup>) resistant) was isolated at the Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Québec, Canada, from a 4-week-old pig with postweaning diarrhoea. O45 strain 86-1390 induces typical attaching and effacing (A/E) lesions both *in vitro* and *in vivo* and contains sequences homologous to the LEE (Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995). A collection of 11 PEPEC strains was used for *in vivo* experiments. *E. coli* strain SM10 $\lambda$ pir(pRT733) was used to introduce Tn*phoA* into strain 86-1390 by conjugation (Harel *et al.*, 1992). *E. coli* strain HB101(supE44 *hsdS*20 (r-m-) *recA*13 *ara*-14 *proA*2 *lacY*1 *galk*2 *rpsL*20 *xyl*-5 *mtl*-1) (Boyer and Roulland-Dussoix, 1969) was used as host for recombinant plasmids in this study. The  $\lambda$ ZAPII<sup>R</sup> system was used for construction of a genomic DNA library from strain 86-1390 (Stratagene, La Jolla, CA). The host strain *E. coli* XL1 Blue MRF' $\{\Delta(mcrA)$ 183,  $\Delta(mcrCB$ -*hsdSMR*-*mrr*)173, *endA*1, *supE*44, *thi*-1, *recA*1, *gyrA*96, *relA*1, *lac*[F'*proAB lacI*<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15, Tn10(tet<sup>R</sup>)]} and *E. coli* SOLR strain {e14-(*mcrA*),  $\Delta(mcrCB$ -*hsdSMR*-*mrr*)171, *sbcC*, *recB*, *recJ*, *umuC*::Tn5(kan<sup>R</sup>), *uvrC*, *lac*, *gyrA*96, *relA*1,  $\lambda^R$ [F'*proAB lacI*<sup>q</sup> Z $\Delta$ M15]Su<sup>r</sup> (nonsuppressing)} as well as the helper phage M13 needed in the cloning procedure were used according to the manufacturer's recommendations (Stratagene). E22 is an *eae*  $\beta$  positive REPEC strains (Oswald *et al.*, 2000).

### **Tn*phoA* mutagenesis**

Mutations were obtained from random insertion of the Tn*phoA* sequence into the chromosomal DNA of *E. coli* strain 86-1390 (Sm<sup>R</sup>, Tc<sup>R</sup>). This was accomplished as described previously (Harel *et al.*, 1992) by using the suicide vector pRT733 which carries the Tn*phoA* insertion and the kanamycin resistance (Km<sup>R</sup>) gene in *E. coli* strain SM10 $\lambda$ pir (Taylor *et al.*, 1987). Exconjugants from the mating between *E. coli* strain SM10 $\lambda$ pir(pRT733) and *E. coli* strain 86-1390 were selected on Luria-Bertani (LB) agar (Difco Laboratories, Detroit Mich.) containing kanamycin and streptomycin (40  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>)

and the alkaline phosphatase substrate XP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Sigma Chemical Co., St-Louis, Mo.). Kanamycin and streptomycin resistant blue colonies resulting from the transposition of *TnphoA* into the genome of the recipient strain *E. coli* 86-1390 were stored in glycerol at  $-70^{\circ}\text{C}$ . Of the  $\text{Km}^{\text{R}}$  and  $\text{Sm}^{\text{R}}$  transposon insertions, 1% were found to produce blue colonies on agar in the presence of phosphatase alkaline substrate XP.

### **Cloning and DNA sequencing of *phoA* fusion regions**

Cloning of the sequence flanking the 5' end of *phoA* fusion regions was done using the kanamycin resistance gene as a selectable marker and the appropriate DNA fragments were cloned into pBR322. One  $\mu\text{g}$  of total DNA isolated from the mutant was digested by *Bam*HI and ligated with 0.1  $\mu\text{g}$  of similarly digested pBR322. The ligation mixture was electroporated into the strain HB101 with a Bio-Rad Gene Pulser according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). Transformants carrying the desired recombinant plasmid were selected on LB agar plates supplemented with ampicillin ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) and kanamycin ( $40 \mu\text{g ml}^{-1}$ ). To precisely identify the mutated gene, the double-stranded plasmid DNA at the junction of the site of *TnphoA* insertion was sequenced using a T7 Sequencing™ Kit (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada) according to the manufacturer's instructions. An oligonucleotide (5'AATAATCGCCTGAGC3') corresponding to nucleotides 72 to 86 of *TnphoA*, synthesized on a Gene Assembler (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada), was used as the primer. DNA sequence data was analysed using the GeneWorks program (Intelligenetics, Inc., CA, USA) and programs included in the GCG (Genetics Computer Group, Madison, WI) package (Devereux *et al.*, 1984). The deduced amino acid sequence was compared against the combined databases of the National Center for Biotechnology Information (Washington, D.C.) via the BLAST network service.

### **Cloning and sequencing of *paa***

To clone the full length of the *paa* gene, corresponding to the gene of the mutant M155 with the *TnphoA* insert, a genomic DNA library of PEPEC strain 86-1390 was constructed in  $\lambda$ ZAPII<sup>R</sup> vector. Chromosomal DNA was partially digested with *Eco*RI and pooled and fractionated through a 10-30% sucrose linear gradient. The desired fragments of 6 to 10 kb were isolated and ligated to dephosphorylated *Eco*RI-digested  $\lambda$ ZAPII<sup>R</sup> vector arms and packaged using an *in vitro* packaging system (Stratagene). Bacteriophage particles were propagated in *E. coli* XL1 Blue and plated for plaque isolation. To screen the recombinant phages, a 350 bp PCR fragment derived from the 5' end of the *paa* gene, was generated by two *paa* specific primers, M155-F1 (5'ATGAGGAAACATAATGGCAGG3') and M155-R1 (5'TCTGGTCAGGTCGTC AATAC3') annealed at 91-110 nt and 428-447 nt of the *paa* gene, respectively. The 350 bp fragment was then radiolabelled with [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]CTP as a probe, using an oligonucleotide random priming labelling kit (Pharmacia LKB) according to the manufacturer's instructions. Positive plaques were selected and excised using the ExAssist helper phage (M13) and *E. coli* SOLR strain system according to the Stratagene  $\lambda$ ZAPII<sup>R</sup> instruction manual. Plasmid DNA was isolated by alkaline lysis and the insert was sequenced by an automated DNA Sequencer (AFL DNA sequencer, Pharmacia LKB) using the *paa* specific oligonucleotides synthesized on a Gene Assembler (Pharmacia LKB).

### **Transcomplementation of the M155 *paa*::*TnphoA* mutant**

The *paa* gene was amplified with its promoter regions from the 86-1390 strain DNA using the PaaHO/F (5'GGATCCTTAAAGGGCAGG3') and PaaHO/R (5'GGATCCGATGTCAAGTGC3') primers and cloned into the pGEM-T vector. The *Bam*HI fragment was then inserted into the *Bam*HI linearised pACYC184 plasmid resulting in the pACYC184-PaaHO construct containing the wild type *paa* gene. This construct was used as a complementation plasmid for *paa* in the M155 *TnphoA* mutant leading to the M155c strain.

### Quantification of A/E capacity of the mutants

The A/E capacity of the *TnphoA* mutants generated in this study was examined by ileal explant culture as previously described (Zhu *et al.*, 1995). Briefly, overnight bacterial cultures were inoculated onto the villus surface of ileal segments from colostrum-deprived newborn piglets and incubated on a rocking platform at 37°C for 8h in an atmosphere of 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. RPMI 1640 culture medium (Gibco, BRL, Burlington, Ont., Canada) was replaced with fresh medium at hourly intervals during the incubation to prevent overgrowth of bacteria. *E. coli* O45 strain 86-1390 and the porcine 862 strain, which does not possess the LEE, were used as positive and negative controls, respectively. Three or four ileal segments were used for each bacterial isolate and the experiments were repeated thrice. In some experiments, broth cultures were incubated at 37°C with equal volume of lyophilised Paa antibody preparation, previously reconstituted with PBS, for 30 minutes prior to the first explant inoculation. Tissues were processed for light microscopy (LM) examination as described previously (Zhu *et al.*, 1995) and the number of intact villi with adherent bacteria was counted. Tissues were then further examined by transmission electronic microscopy (TEM). Small ileal sections (3 mm x 3 mm) were fixed for 2 hours at room temperature in 2.5% (v/v) glutaraldehyde, then rinsed in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate, pH 7.3) for 1.5 hours with regular changes. Tissues were then post-fixed for 1 hour at room temperature in 2% osmium tetroxyde (OsO<sub>4</sub>), rinsed in water for 1.5 hours with regular changes, dehydrated in a graded ethanol series, and finally embedded in Spurr resin (Marivac, Nova Scotia, Canada). Thin sections were mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with an transmission electron microscope at 80 kV (model 420, Philips electronics, The Netherlands).

### Southern analysis

The number of *TnphoA* insertions was determined by Southern blot analysis as described previously (Harel *et al.*, 1992). Briefly, total DNA was extracted from strain by sodium dodecyl sulphate lysis, proteinase K treatment, phenol chloroform extraction, and ethanol precipitation. Extracted DNA was digested with the restriction endonuclease *SacI* or *EcoRV*, which do not cut within *TnphoA*, under conditions described by the

manufacturer (Pharmacia LKB). After separation by electrophoresis in a 0.7% agarose gel, DNA preparations were examined by Southern hybridisation. An internal *HindIII*-*Bam*HI fragment of *TnphoA* radiolabelled with [ $\alpha$ - $^{32}$ P]CTP, using an oligonucleotide random priming labelling kit (Pharmacia LKB) according to the manufacturer's instructions, was used as a probe.

### **Chromosomal localisation of *paa* gene**

Firstly, the presence of *paa* between the *rem* and *rel* loci was investigated by PCR amplification. The *remF* (5'GATGCCTGCCACATCAGAGG3') and *relR* (5'CCTAAGCCAGTACGTGTGAC3') primers located at 2821-2840 bp and 3400-3420 bp, respectively, were used to amplify a 580 bp fragment on the *E. coli* K-12 strain MG1655 chromosome. The *PaaR* primer (5'GCTACAAACCGATGAAGCGGC3') was used in combination with *remF* to detect an insertion of the *paa* gene between the *rem* and *rel* loci leading to a 605 bp amplicon. Secondly, the integrity of the *yciD-yciE* region was tested with the *YciDF* (5'AGTGGCGGCTTTGGCACTAA3') and *YciER* (5'CGAATCTATGCTTGAATCCA3') primers. They were used to amplify a 1122 bp fragment on the MG1655 chromosome. The PCR mixture was : 5  $\mu$ l of template DNA, 5  $\mu$ l of 2mM dNTP, 5  $\mu$ l of 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl pH 8.3), 2.5  $\mu$ l of each primer pairs (25 pmol), 1 U of Taq DNA polymerase (Pharmacia) and sterile distilled water to 50  $\mu$ l. The following cycles were used: 1 X 94°C for 2 min., and 30 X (94°C for 30 s, 60°C for 45 s, 72°C for 30 s) with a final extension of 72°C for 7 min. The PCR products were analysed by agarose gel electrophoresis.

### **Non-polar mutation in *paa***

The mutation of the *paa* gene was obtained by the following strategy. A PCR fragment containing the gene and its promoter sequences was amplified with the *PaaHO/F* (5'GGATCCTTAAAGGGCAGG3') and *PaaHO/R* (5'GGATCCGATGTCAAGTGC3') primers, and cloned into pGEM-T vector (Promega) according to the manufacturer's instructions. The construct was digested with *KpnI* and an *HincII* fragment from pSB315 containing a kanamycin resistance cassette was ligated in the *KpnI* site resulting in



*paa::kan*. The construct was digested with *Bam*HI and the *paa::kan* fragment was ligated to the pKNG101 suicide vector cut with the same enzyme. The resulting construct was transferred to strain S17  $\lambda$ *pir*, from which it was mobilized into strain E22 using the membrane filter mating technique. Transconjugants were selected on M9 agar containing the appropriate antibiotic (kanamycin 50  $\mu$ g/ml). Selection for double-crossover allele replacement was obtained by *sacB* counterselection on LB agar plates without NaCl and containing 5% sucrose (Kaniga *et al.*, 1991).

### **Pulsed field gel electrophoresis**

Strains 86-1390, M155, STJ348 (O157:H7) and E2348/69 (EPEC) were inoculated 1/100 in 20 ml of LB medium and incubated at 37°C overnight with agitation. Bacteria were washed two times in SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.5) by centrifugation and resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). The optical density of the cells was adjusted to 1.5 – 1.8 at a wavelength of 600 nm. Low-melt agarose (Gibco BRL, Burlington, Ont., Canada) was prepared in distilled water to obtain a final concentration of 1.5%. Plugs were formed by mixing 500  $\mu$ l of bacterial suspension with 500  $\mu$ l of prewarmed (60°C) agarose. This mixture was then pipetted into plug molds (Bio-Rad Laboratories). After the plugs solidified, they were incubated at 50°C overnight in lysis buffer (1% w/v N-laurylsarcosine, 0.5 M EDTA, pH 9.5, supplemented with 1mg/ml proteinase K). The lysis buffer was changed and plugs were incubated for another 4 hours. Plugs were washed three times for 1 hour each time with 1mM PMSF in 10 mM Tris-HCl, pH 8. Another set of three 30 minutes washes was done with 10 mM Tris-HCl, pH 8. The plugs were then preincubated for 30 minutes with 1 ml of the appropriate restriction enzyme buffer. The buffer was replaced by a fresh mixture containing 30-40 units of enzyme and incubated overnight at the appropriate temperature (37°C for *Xba*I and 50°C for *Sfi*I). The next day, 10 units of enzyme was added to the plugs for a 2-3 hour incubation period. Electrophoresis of the samples was performed on the CHEF-DRII system by using a 1% pulsed-field grade agarose gel (Sigma) with 2 litres of modified 0,5X TBE running buffer (10X TBE : 89 mM Tris-borate, 25mM EDTA, pH=8.3). The running conditions were as follows : switch of 5-35 sec, 6 volts/cm, run time 20h. Finally, the gel was stained

in 10 mg/ml ethidium bromide in distilled water for 30 minutes. Digested genomic DNA separated in agarose gels was transferred to positively charged nylon membranes (Immobilon-Ny<sup>+</sup>, Millipore Corporation, Bedford, MA) in accordance with the manufacturers' instructions and hybridised under stringent conditions as described by (Sambrook, 1989). The probe was labelled with biotin by PCR amplification using PaaF (5'GGATCCATGAGGAACATAA3') and PaaR (5'CTCGAGAGTGCCTTTCCTGG3').

### **Production of anti-Paa antibodies**

The *paa* gene of strain 86-1390 was amplified by PCR using primer pairs Paa mature F (GGATCCATGAGGAACATAA) and Paa mature R (CTCGAGAGTGCCTTTCCTGG). The amplicon was inserted into the pQE-30 expression vector (Qiagen) using appropriate cloning sites and fusion was confirmed by sequencing. *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen) was used as the host strain for the expression of recombinant His-Paa. The His-Paa was purified from a Ni-NTA affinity column (Qiagen). Laying hens of 25-weeks of age were immunized intramuscularly (IM) with 500 µl of incomplete Freund's adjuvant (IFA) and an equal volume of purified His-Paa, corresponding to 50 µg of protein. Paa-specific IgY was then extracted from egg yolks by the method described by Akita and Nakai (1993), with some modifications. Briefly, egg yolks were separated from the albumin. An equal volume of Phosphate Buffered Saline (PBS) was added to the egg yolks, then homogenized by Vortex agitation. An equal volume of chloroform was added, then mixed until a solid homogenate was obtained. The preparation was centrifuged 5 minutes at 14 000 x g, and supernatant containing IgY was recovered and conserved lyophilized until use. The Anti-Paa IgY titer was determined by ELISA using microtiter plates (Immulon 2HB, Dynec) precoated with 100 ng of purified proteins in carbonate buffer (pH 9.6)

### **Infection of gnotobiotic piglets**

Eleven porcine O45 strains were tested for A/E activity in experimentally inoculated newborn gnotobiotic piglets as previously described (Zhu *et al.*, 1994). Briefly, aseptically collected piglets were inoculated intragastrically with 10 ml of an overnight culture of *E.*

*coli* (approximately  $10^9$  CFU) and 10 ml of 0.1% peptone water. They were examined several times daily for development of clinical signs and necropsied when diarrhoea occurred or at 120 h post inoculation (p.i.) if clinically normal.

### **Statistical analysis**

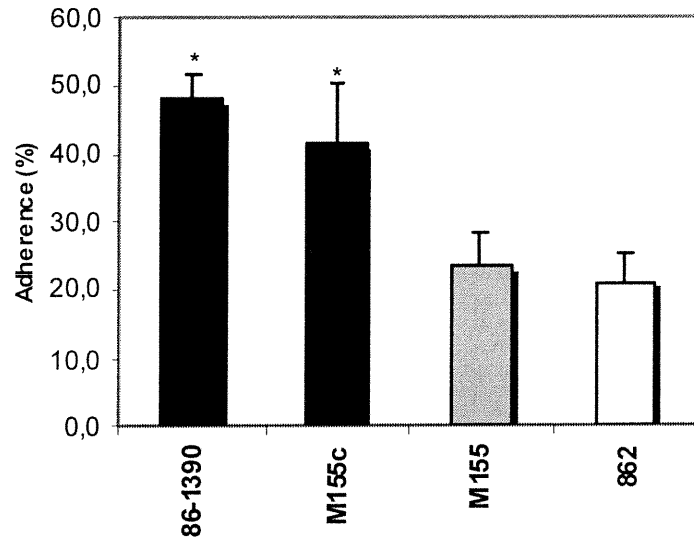
Results are presented as the mean  $\pm$  the standard deviation of the mean. A Kruskal-Wallis test was performed with commercially available software (SAS 8.1, Cary, North Carolina, USA), and post hoc 2-by-2 comparisons were done to assess differences between the groups;  $P < 0.0001$  was taken to be significant.

**Acknowledgements**

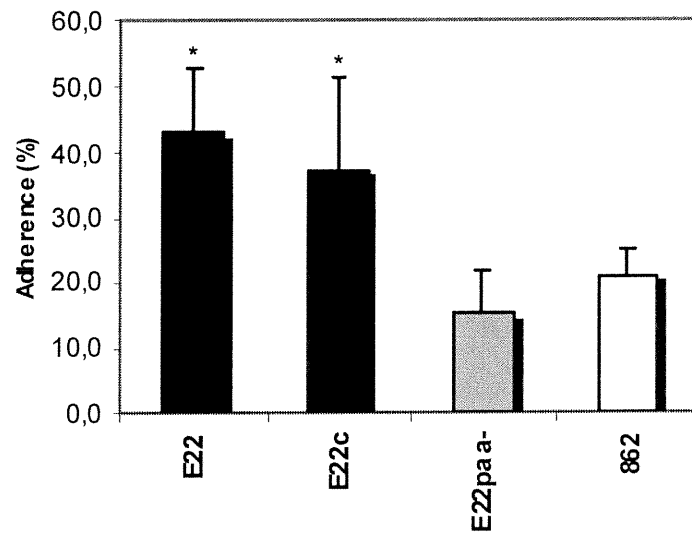
This work was supported in part by the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR) grant 0214, by the Natural Sciences Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 215841-98 and by EU-Community "Quality of Life" QLK2 2000-0060. We thank Bernadette Foiry for her technical assistance, Guy Beauchamp for statistical analysis, Diane Montpetit for electronic microscopy, Hojabr Dezfulian for PFGE and John Leong for critical reading of the manuscript.

**Figure 1**

a)



b)



a) *paa* mutant strain M155 (n=18) shows a decreased number of intact ileal villi with bacterial adherence to epithelial cells, compared to wild-type PEPEC strain 86-1390 (n=12) and to the complemented mutant strain M155c (n=20). The porcine strain 862 (n=15), which has not the LEE, was used as negative control.

b) *paa* mutant strain E22  $\Delta paa$  shows decreased number of intact ileal villi compared to wild-type REPEC strain E22 and to the complemented mutant strain E22c.

Error bars show the standard deviation. The asterisk indicates a statistically significant difference ( $P < 0.0001$ , when compared by Kruskal-Wallis tests) from the negative control strain 862.

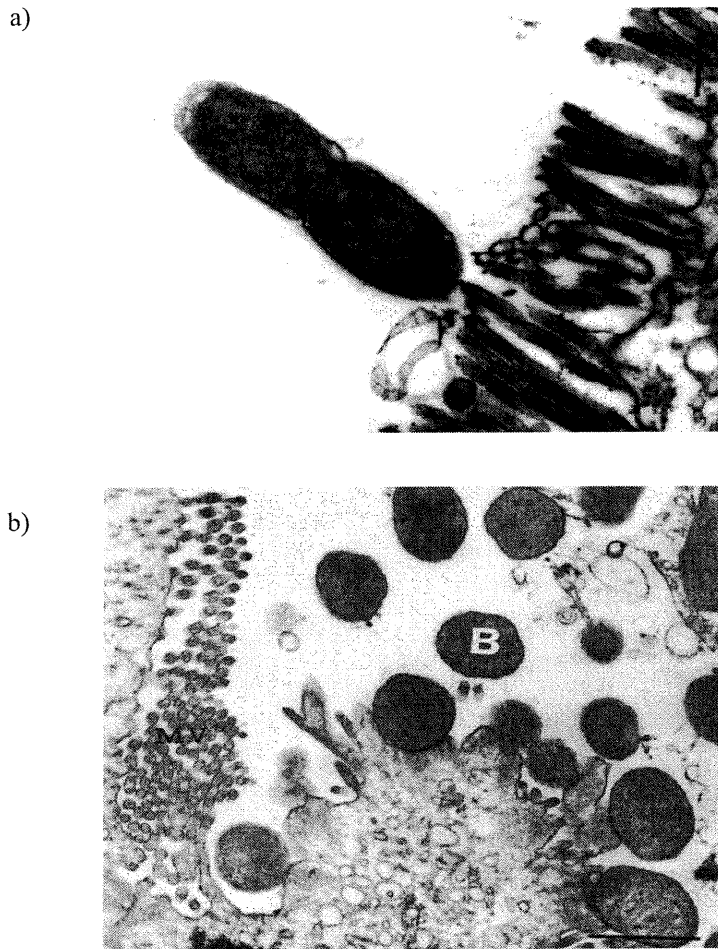
**Figure 2**

Fig. 2: Transmission electron micrographs of the ileal explant cultures inoculated with *TnphoA* mutant M155 (a) and with the wild type O45 strain 86-1390 (b). Reduced attachment and effacement of microvilli were observed for the mutant M155 whereas A/E lesions were observed for the wild type 86-1390 strain. Similar A/E lesions were observed for the M155c strain (data not shown). No adherence was seen with the negative control 862 strain (not shown). MV= Microvillosities, B = Bacteria, Bar = 1  $\mu$ m.

Figure 3

	AGG TAA GTC GGA TAA <u>GTT TAT CTG</u> GAT GTA ATA																				
		-35																			
			RBS																		
		-10	TAT	<u>ATT</u>	ATT	TCT	CTC	TTT	ATA	ACT	TTA	TTT	CAT	GAT	AAC	CAA	TAA	<u>AAG GAG</u>	<u>TTT</u>	<u>TTT</u>	
	M	R	N	I	M	A	G	F	L	I	F	L	S	S	A	A	Y	A			18
	<b>ATG</b>	AGG	AAC	ATA	ATG	GCA	GGT	TTT	TTA	ATA	TTC	CTG	TCT	TCT	GCT	GCT	TAT	GCT			54
	D	I	N	L	Y	G	P	G	G	P	H	T	A	L	L	D	A	A			36
	GAT	ATC	AAT	CTG	TAT	GGT	CCT	GGT	GGC	CCG	CAT	ACA	GCC	TTG	CTT	GAT	GCA	GCC			108
	K	L	Y	A	E	K	T	G	I	I	V	N	V	H	Y	G	P	Q			54
	AAA	CTT	TAT	GCC	GAA	AAA	ACA	GGT	ATT	ATA	GTG	AAC	GTT	CAT	TAC	GGC	CCA	CAG			162
	N	K	W	N	E	D	A	K	K	N	A	D	I	L	F	G	A	S			72
	AAC	AAA	TGG	AAT	GAA	GAT	GCC	AAA	AAA	AAT	GCA	GAT	ATC	TTG	TTT	GGC	GCA	TCA			216
	E	Q	S	A	L	A	I	I	R	D	H	K	D	S	F	S	E	K			90
	GAA	CAA	TCT	GCT	CTG	GCT	ATC	ATT	CGG	GAC	CAT	AAA	GAC	AGC	TTC	AGT	GAA	AAA			270
	D	I	Q	P	L	Y	L	R	K	S	I	L	L	V	K	K	G	N			108
	GAT	ATT	CAG	CCT	CTT	TAT	CTG	CGA	AAA	AGT	ATT	TTA	CTG	GTA	AAG	AAA	GGT	AAT			324
	P	K	N	I	R	S	I	D	D	L	T	R	P	G	I	G	V	I			126
	CCT	AAA	AAT	ATC	CGG	AGT	ATT	GAC	GAC	CTG	ACC	AGA	CCT	GGG	ATT	GGC	GTA	ATT			378
	V	N	D	G	G	G	T	S	N	T	S	G	T	G	V	W	E	D			144
	GTT	AAT	GAT	GGT	GGT	GGT	ACC	AGT	AAT	ACA	TCA	GGC	ACT	GGC	GTC	TGG	GAA	GAT			432
	I	A	G	R	K	G	N	I	E	T	V	A	A	I	R	K	N	I			162
	ATT	GCC	GGA	CGT	AAA	GGG	AAT	ATA	GAA	ACT	GTC	GCC	GCA	ATC	CGA	AAA	AAT	ATT			486
	I	L	Y	A	P	N	S	G	T	A	R	K	A	L	E	N	Q	P			180
	ATT	TTA	TAT	GCG	CCC	AAT	AGC	GGA	ACT	GCA	CGT	AAG	GCT	CTT	GAG	AAT	CAG	CCT			540
	G	A	D	V	W	I	T	W	A	D	W	A	A	S	N	P	E	I			198
	GGA	GCA	GAT	GTC	TGG	ATA	ACC	TGG	GCT	GAC	TGG	GCA	GCC	AGT	AAT	CCA	GAA	ATT			594
	G	D	V	V	E	I	A	P	D	Y	V	I	W	R	D	M	N	I			216
	GGT	GAT	GTC	GTG	GAA	ATA	GCG	CCA	GAC	TAC	GTG	ATA	TGG	CGT	GAT	ATG	AAC	ATT			648
	T	V	R	Q	D	A	N	D	E	T	R	R	F	A	E	W	L	Q			234
	ACA	GTA	CGT	CAG	GAT	GCA	AAT	GAT	GAA	ACC	CGT	CGA	TTT	GCA	GAA	TGG	CTA	CAA			702
	T	D	E	A	A	P	A	F	K	K	Y	G	W	T	R	K	G	T			252
	ACC	GAT	GAA	GCG	GCG	CCT	GCA	TTC	AAA	AAA	TAT	GGC	TGG	ACC	AGG	AAA	GGC	ACT			756
	L	E	N	H																	257
	CTC	GAG	AAT	CAC	<b>TAG</b>	ACT	TGA	CAT	<u>CCT</u>	<u>CGT</u>	<u>CCT</u>	<u>TCA</u>	<u>GGA</u>	<u>CGT</u>	<u>GGG</u>	ATT	CTT	TTT	C		

The nucleotide and deduced amino acid sequences of *paa* and of its flanking sequences. The putative -10 and -35 promoter sites, the ribosome binding site (RBS) and the putative transcription terminator are underlined. The translation initiation codon and the TAG translation termination codon are in boldface type. The vertical arrow indicates the potential peptide signal cleavage site. Arrowhead represents the insertion site of *TnphoA*.

Figure 4

```

Paa          MRN-----IMAGFLIFLSSAAYADINLYGPGGPHTALLDAAKLYAE-----KTGII 46
O157_H7     MRN-----IMAGFLIFLSSAAYADINLYGPGGPHTALLDAAKLYAE-----KTGII 46
AcfC        MKSK----NRFL LISLLSFSTSVFADVNL YGPGGPHVPLIKVAESFEK-----SQSKR 49
PEB3        MKKFSLVAATLIAGVVLNVNAATVATVNGKSIDSTEVEFFAPMLRGQDFKTLDPDNQKKA 60
          *: .      : :      : : . . . . * : * . . . . . : . . : .

Paa          VNVHYGPONKWNEDAKKN---ADILFGASEQSALAIIRDHKDSFSEKDIQPLYLRKSILL 103
O157_H7     VNVHYGPONKWNEDAKKN---ADILFGASEQSALAIIRDHKDSFSEKDIQPLYLRKSILL 103
AcfC        VNITFGPQATWNDKAKKN---ADILFGASEHSALAI AEGHSERFSKFNHPVFMREAIL 106
PEB3        LIQQYIMQDLILQDAKKQNKLEKDPlyTKELDRAKDAILVNVYQEKILNTIKIDAAKVKAF 120
          : : *      : .***: * * : . . *      : . : : : : :

Paa          VKKGNPKNIRSIDDLTRPGIGVIVNDGGGTSNTSGTGVWEDIAGRKN IETVAAIRKNII 163
O157_H7     VKKGNPKNIRSIDDLTRPGIGVIVNDGGGTSNTSGTGVWEDIAGRKN IETVAAIRKNII 163
AcfC        VKKGNPKNIKGMADLLKPGIGIVVNDGAGVSN TSGTAVWEDSVGRMKVVEKLAQFRSNIH 166
PEB3        YDQNKDKYVKPARVQAKHILVATEKEAKDI INELKGLKGLKELDAKFSELAKEKSIDPGSK 180
          . . . * : :      : :      : : . . *      : : . : : . : :

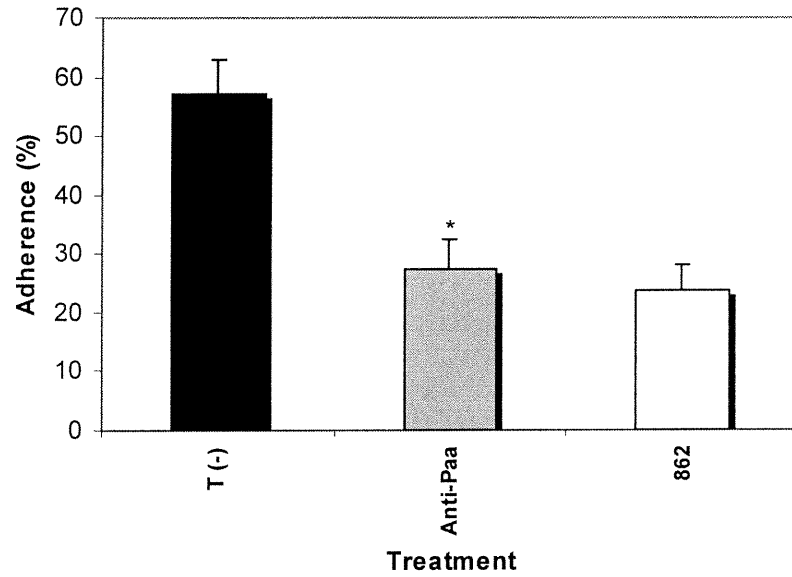
Paa          LYAPNSGTARKALENQPGADVWITWADWAAASNP----EIGDVVEIAPDYVIWRDMNITVR 219
O157_H7     LYAPNSGTARKALENQPGADVWITWADWAAASNP----EIGDVVEIAPDYVIWRDMNITVR 219
AcfC        VFAPNSGSARKAFVDGEDIDAWITWVDWAIANP----TIGDMVRMEDEYRIYRDFNVVLA 222
PEB3        NQGGELGWFDQSTMVKPFTDAAFALKNGTITTTTPVKTNFGYHVILKENSQAQKQIKFDEV 240
          . : *      : :      * . : : : : . . : * * : :      : : .

Paa          QDANDETRRFAEWLQ-TDEAAPAFKKYGWTRKGT 252
O157_H7     QDANDETRRFAEWLQ-TDEAAPAFKKYGWTRKGT 252
AcfC        KNPSSEAI DFFDYLT KSKDAE AIFQHYGWFK--- 253
PEB3        KQGIENGLKFEF KVINQKGQDLLNSAKVEYK- 273
          : : . : * : :      : :      : : . . .

```

Alignment of the deduced amino acid sequences between the Paa of the 86-1390 strain and the Paa protein of the O157:H7 EDL933 and Sakai *E. coli* strains, the AcfC protein of *Vibrio cholerae* and the PEB3 protein of *Campylobacter jejuni*. \* represents identical or conserved residues in all sequences in the alignment. : indicates conserved substitutions and • indicates semi-conserved substitutions. The amino acid sequence alignment was performed using the Clustal W program.



**Figure 5**

Reduction of the percentage of intact villi showing intimate adherence when pig ileal explants were inoculated with strain 86-1390 following treatment with anti-Paa antibodies, compared to explants treated with antibodies from hens immunized with a sonicate preparation from host strain M15 (pREP4), T(-). The porcine strain 862, which has not the LEE, was used as negative control.

**Table 1**

<b>Strains</b>	<b>Total</b>	<b><i>yciDE</i> negative</b>	<b><i>yciDE</i> positive</b>
EHEC	4	3	1
REPEC	7	2 (E22, RDEC-1)	5
PEPEC	14	9 (86-1390)	5
Total	25	14 (56%)	11 (44%)

The integrity of the *yciDE* region in *paa* positive strains was tested by PCR with primers YciDF (5'AGTGGCGGCTTTGGCACTAA3') and YciER (5'CGAATCTATGCTTGAATCCA3') amplifying a 1122 pb fragment on the *E. coli* MG1655 chromosome (control). Strains considered positive also amplified a 1122 pb fragment, whereas no amplification was seen in the negative strains.

**Table 2**

Porcine O45 strains <i>eae</i> and LEE positive	No of pigs with diarrhoea /no inoculated	Onset of diarrhoea (h) <sup>b</sup>	Extent of A/E lesions <sup>d</sup>	Presence of <i>paa</i> gene
81-4420	2/2	24	++++	+
86-1390	2/2	30	++++	+
91-19-172	2/2	35	++++	+
90-2061	2/2	39	+++	+
90-1513	2/2	41	+++	+
88-4299	1/1 <sup>a</sup>	44	++	+
86-4733	2/2	70	+	+
83-2315	2/2	83	++	-
88-1861	1/1 <sup>a</sup>	91	-	-
89-56-196	1/2	96	-	-
82-4378	0/2	NM <sup>c</sup>	+	-
81-1786	1/2	85	-	-
Control <i>eae</i> neg				

Clinical and histopathological findings in piglets inoculated with porcine *E. coli* O45 isolates. <sup>a</sup>: One piglet died of causes unrelated to the infection within 20h after birth. <sup>b</sup>: Mean time of onset of diarrhoea post-inoculation. <sup>c</sup>: NM, non measurable data. <sup>d</sup>: +++++, extensive bacterial colonization and severe effacement of microvilli; +++, large areas of bacterial colonization and heavy effacement; ++, focal lesions; +, small scattered focal lesions; -, no lesions observed.

## Section III: Discussion

## Discussion

Les souches de *Escherichia coli* attachant-effaçant (ou AEEC) ont la capacité de causer des lésions appelées attachant-effaçant. Les souches impliquées sont : *E. coli* entérohémorragique (entre autres O157 : H7), *E. coli* entéropathogénique (EPEC) qui est une cause majeure de diarrhées infantiles à travers le monde et qui sert de modèle pour comprendre l'infection, les EPEC de lapin (REPEC), de porc (PEPEC), de chien (DEPEC) (Cantey and Blake, 1977; Nataro and Kaper, 1998; Zhu *et al.*, 1994).

Les lésions attachant-effaçant (AE) sont des lésions histopathologiques caractéristiques qui sont définies par l'attachement intime de la bactérie sur la surface des cellules intestinales et l'effacement des microvillosités de la cellule hôte. Des réarrangements du cytosquelette, dont un recrutement d'actine sous la bactérie adhérente, résultent en la formation d'une structure en forme de piédestal qui semble supporter la bactérie (Staley *et al.*, 1969).

L'apparition de lésions AE nécessite les produits d'une série de gènes encodés par un îlot de pathogénicité chromosomique nommé LEE (Locus of Enterocyte Effacement). Le locus a une taille qui varie chez les différentes souches. Il est inséré dans différents endroits (*selC* chez PEPEC) et inclus entre autres les gènes *tir*, *eae* et *espABD* (An *et al.*, 2000; Donnenberg *et al.*, 1997b; McDaniel *et al.*, 1995; Mellies *et al.*, 1999; Sperandio *et al.*, 1998; Wieler *et al.*, 1997).

Les souches PEPEC de sérotype O45 sont souvent isolées dans les cas de diarrhées post-sevrage chez les porcelets (Helie *et al.*, 1991). Ces souches possédant le gène *eae* et induisent des lésions AE (Beaudry *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1995b). Il a été montré que ces souches possèdent aussi le LEE. Le séquençage des gènes *eae* *espABD* et *tir* (chez la souche 86-1390) a démontré une homologie avec les mêmes gènes chez d'autres AEEC (An *et al.*, 2000). Il y a presque une identité complète avec ces gènes chez la souche RDEC-1 (REPEC).

La création d'une banque de mutants *TnphoA* dans la souche PEPEC 1390 (sérotype O45) a permis d'identifier un nouveau locus génétique impliqué dans la formation des lésions AE et appelé *paa* (An, 1998).

Le gène *paa* contient 753 pb et sa séquence est retrouvée dans Genbank sous le numéro d'accèsion U82533 (*paa* portait auparavant le nom de *anm*). Il y a une forte

corrélation entre la présence de *paa* et celle de *eae* chez EHEC O157:H7 et O26, chez les isolats de chiens, de lapins et de porcs. Aussi, la présence de *paa* est associée à la formation des lésions, tandis que l'absence de *paa* mène à une inhibition ou à un retard dans la formation des lésions. Paa possède des homologies avec des protéines bactériennes impliquées dans la virulence.

Les mutants E22  $\Delta paa$  (souche lapine) et 86-1390 *paa::TnphoA* (souche porcine) ont montré une réduction ou une inhibition de l'adhérence à une cellule-hôte dans un modèle d'explants de porc. *In vivo*, les isolats O45 ne possédant pas *paa* ne causaient pas de diarrhée chez les porcelets ou la provoquaient avec un retard. De plus, lors d'infections expérimentales sur des explants d'intestins de porcelets, des anticorps anti-Paa bloquent un pourcentage significatif d'adhésions des bactéries. Tous ces résultats suggèrent une implication de Paa dans les premières étapes de l'infection.

Mon apport à cette étude comprenait quatre grands objectifs soit :

- Étude bioinformatique du gène *paa* et de la protéine Paa
- Caractérisation de la région du génome portant *paa*
- Étude de la régulation de l'expression de *paa* (voir Annexe 1 pour matériel/méthodes et résultats)
- Création d'une souche mutante isogène pour le gène *paa*

### **1. Étude bioinformatique du gène *paa* et de la protéine**

Le gène possède un promoteur qui semble typique pour le facteur sigma 70 avec sa boîte -10 et -35 (voir figure 1 de l'article). L'homologie de la séquence consensus -10 est assez bonne (cinq nucléotides sur six, soit 83% d'identité), mais l'est un peu moins pour la séquence -35 (quatre nucléotides sur six, soit 67% d'identité). Il semble que les deux nucléotides qui diffèrent dans le cas de la séquence -35 engendreraient des effets sévères sur la transcription (Watson *et al.*, 1983). L'espacement optimal entre ces deux boîtes est de 17 nucléotides et on ne compte que dix nucléotides dans le cas du promoteur de *paa*. On note de plus la présence d'un site de liaison du ribosome (séquence Shine-Dalgarno). Il y a, à la fin du gène, une structure ressemblant à celle d'un terminateur Rho-indépendant (figure 1 de l'article) avec une séquence inversée répétée riche en GC qui pourrait former une

structure en épingle, suivie d'une série de T. Cette structure secondaire permettrait à la ARN polymérase ADN-dépendante de relâcher la molécule d'ARN nouvellement synthétisée et de se dissocier de son substrat d'ADN. La présence d'un promoteur et d'un terminateur possible suggère que *paa* ne fait pas partie d'un opéron.

Le contenu en G+C de *paa* est de 44% ce qui est significativement plus faible que chez *E. coli* K-12, soit 50.8% (Blattner *et al.*, 1997). Le contenu en G+C du génome varie chez les différents organismes. Il semble donc que la portion d'ADN qui contient *paa* provienne d'un autre organisme bactérien possédant un contenu en G+C plus faible que *E. coli*. Cette région a donc pu être obtenue via un transfert horizontal soit par conjugaison, par transformation ou par transduction. Ceci serait indicatif d'un îlot de pathogénicité. Ceux-ci portent des gènes codant pour des facteurs de virulence. En plus de posséder un contenu en G+C différent, ils contiennent souvent des séquences de phages, et/ou d'éléments d'insertion, de séquences répétées et sont souvent associés à des loci d'ARNt (Hacker and Kaper, 2000).

Le poids moléculaire de la protéine est estimé à 27,6 kDa (251 acides aminés). La protéine est instable selon l'analyse des agencements des différents couples d'acides aminés (logiciel ExPASy) et cette instabilité semble provenir de la région N-terminale, soit les 84 premiers acides aminés. L'analyse par le logiciel Psort prédit un site de clivage entre l'acide aminé 18 et 19 qui semble délimiter un peptide signal Sec-dépendant. La protéine serait donc extra-cytoplasmique, puisque le système Sec permet l'insertion de la protéine dans la membrane cytoplasmique via son peptide signal. Ce dernier serait ensuite clivé pour permettre le relâchement de Paa dans le périplasma. Selon l'algorithme développé par Kyte et Doolittle (logiciel ProtScale), la protéine est majoritairement hydrophile, sauf pour le N-terminal, qui est plutôt de caractère hydrophobe, ce qui correspond avec une translocation de la protéine au travers la membrane interne via le système Sec. Le caractère hydrophile de la protéine mature indiquerait que la protéine se retrouve dans un milieu «liquide», soit l'espace périplasmique ou le milieu externe.

Paa est identique à 100% avec la même protéine des souches entérohémorragiques EDL933 et Sakai (O157:H7) (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001). Elle possède aussi des homologues de séquence avec des protéines impliquées dans la virulence de *C. jejuni* et *V. cholerae*, soit PEB3 et AcfC respectivement. Paa possède 58,1% d'identité avec PEB3 et

49% avec AcfC. PEB3 est un antigène majeur qui est instable lorsque isolé à des températures supérieures à 0°C. Cette protéine possède des homologies avec des structures reliées à l'adhérence à une cellule-hôte, soit avec la piline de classe I de *Neisseria meningitidis* et avec une sous-unité de l'entérotoxine B thermosensible de *E. coli*. Des anticorps contre PEB3 ont été retrouvés dans le sang d'individus infectés par *C. jejuni* ou *C. coli* (Pei *et al.*, 1991). AcfC fait partie d'un locus contenant quatre gènes (*acfABCD*) impliqués dans la synthèse d'un facteur de colonisation accessoire et son expression est contrôlée par l'activateur ToxR (Parsot and Mekalanos, 1992). Une mutation dans un de ces quatre gènes réduit la capacité de *V. cholerae* à coloniser les intestins de souris (Peterson and Mekalanos, 1988). Ce facteur de colonisation accessoire pourrait constituer un pilus différent du «toxin coregulated pilus» (TCP) ou encore servir de mécanisme de séquestration d'un nutriment nécessaire (Peterson and Mekalanos, 1988). Le locus *acf* fait partie de l'îlot de pathogénicité VPI (*Vibrio cholerae* pathogenicity island) qui est associé aux souches de *Vibrio cholerae* causant épidémie et pandémie. VPI contient entre autres le gène *tcpA*, qui encode un important facteur de colonisation (TCP) ainsi que *toxT*, *tcpP* et *tcpH* qui encodent des régulateurs de gènes de virulence (Karaolis PNAS 1998).

Le logiciel DART (Domain architecture retrieval tool) nous indique des homologies entre les 150 derniers acides aminés de Paa et des domaines de liaison au sulfate. Ces motifs de liaison au sulfate sont souvent retrouvés chez des adhésines de microorganismes comme par exemple : une protéine de la membrane externe de *Helicobacter pylori* qui permettrait à la bactérie d'éviter la phagocytose, des protéines de la membrane externe de *Pseudomonas aeruginosa* se liant aux cellules épithéliales respiratoires, l'adhésine Opc de *N. meningitidis*, et des protéines de surface de *Chlamydia trachomatis* permettant de former un pont avec les cellules eucaryotes (Chen *et al.*, 1996; Chmiela *et al.*, 1997; de Vries *et al.*, 1998; Plotkowski *et al.*, 2001; Ruiz-Bustos *et al.*, 2001). Il a aussi été reconnu que certaines bactéries (*Staphylococcus*, *Yersinia*, *Neisseria*, *H. pylori* et *Streptococcus pyogenes*) peuvent lier à leur surface des polysaccharides sulfatés (Plotkowski *et al.*, 2001; Rostand and Esko, 1997). Ces derniers permettent une liaison indirecte de la bactérie avec une cellule hôte via diverses protéines comme la vitronectine et la fibronectine. Il est connu que la vitronectine et la fibronectine peuvent servir d'intermédiaires entre la bactérie et les récepteurs d'intégrines d'une cellule hôte, ce qui entraîne la colonisation et l'invasion des



cellules épithéliales par les bactéries (Duensing *et al.*, 1999). Le motif de liaison au sulfate de Paa pourrait donc permettre une interaction directe avec une protéine de la surface de la cellule hôte, ou plutôt une liaison indirecte nécessitant un ou plusieurs intermédiaires.

## 2. Caractérisation de la région du génome portant *paa*

Une étude par électrophorèse en champs pulsés a montré que *paa* semble présent en une seule copie dans le génome de souches porcine 86-1390, EHEC humaine STJ348 et lapine RDEC-1. Lors de l'identification de *paa* les séquences adjacentes ont été séquencées pour un total connu de 3,5 kb (An, 1998). En aval de *paa*, on a identifié le gène *rem* qui est aussi retrouvé chez *E. coli* K-12 à 35,4 minutes sur le chromosome. Chez K-12, *rem* est situé tout de suite en aval de *relB*.

Nous avons alors crû que la région *relB-rem* était interrompue dans la souche 86-1390 et que *paa* s'y était inséré. Par PCR, nous avons observé que la région *relB-rem* était bel et bien interrompue et que la séquence *paa-rem* était conservée chez 22 sur 31 souches (71%) EHEC ou EPEC provenant soit d'humains, de lapins, de porcs ou de chiens. Nous en avons conclu que la région contenant *paa* était située à 35,4 minutes par rapport au chromosome de K-12, et qu'elle interrompait le locus *relB-rem*.

Cependant, lorsque les génomes de deux souches EHEC (EDL933 et Sakai) ont été séquencées, nous avons remarqué qu'il y avait une identité de 100% entre la région de 3,5 kb de notre souche 86-1390 et cette même région chez les souches EHEC. Aussi, chez EDL933 et Sakai, *paa* était plutôt situé dans une grande région, respectivement de 103,1 kb (îlot O #57) et 58,2 kb, insérée à 28 minutes par rapport au chromosome de *E. coli* K-12, soit entre *yciD* et *yciE*. Ces grandes régions sont spécifiques à O157:H7 puisqu'elles ne sont pas retrouvées chez K-12. De façon surprenante, les génomes des deux souches EHEC ne possèdent aucun gène *relB*. Pour simplifier l'analyse, nous ne nous en tiendrons qu'à la souche Sakai. Sa région de 58,2 kb est en fait un prophage semblable à lambda. Le prophage en entier code pour plusieurs protéines possibles : majoritairement des protéines de phage, comme des intégrases, excisionases, exonucléases, régulateurs de division cellulaire, protéine de réplication et certaines protéines plus typiquement bactériennes comme des sous-unités de fimbriae, mais aucun fimbriae complet et bien entendu, *paa*. Certains des gènes du prophage encodent des protéines associées à la virulence, comme des

homologues de Lom and TrcA. Lom est une protéine de la membrane externe qui est produite par un lysogène et confère à *E. coli* K-12 la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales buccales (Barondess and Beckwith, 1990; Vica Pacheco *et al.*, 1997). TrcA est une protéine chaperon, retrouvée chez les EPEC et impliquée dans la formation du BFP (Tobe *et al.*, 1999). Le prophage comprend aussi une bonne quantité de protéines hypothétiques dont la fonction est encore inconnue. Il y a aussi deux gènes d'ARNt (leucine et arginine), ils sont situés au milieu de la région, ils ne servent donc pas de site d'insertion d'îlot de pathogénicité mais plutôt pourraient contribuer à une bonne expression des gènes encodés par ce prophage. Le prophage semble défectueux puisqu'il contient des insertions d'éléments IS et des délétions (Ohnishi *et al.*, 2001). Cette grande région pourrait être un îlot de pathogénicité. Par PCR, sur des souches *paa+*, nous avons démontré que la région *yciD-yciE* est interrompue chez un total de 56% des souches EPEC de porc, de lapin et EHEC humaines donc il semble que *paa* puisse être inséré à au moins deux différents endroits dans le chromosome selon les différentes souches.

### 3. Étude de la régulation de l'expression de *paa*

La régulation de l'expression du gène a été étudiée à l'aide de la souche 86-1390 où il y a une insertion du transposon *TnphoA* dans *paa* (mutant M155). Le *TnphoA* contient le gène *phoA* tronqué c'est-à-dire sans promoteur et sans le peptide leader nécessaire pour le transport transmembranaire de la phosphatase alcaline, ce qui permet une fusion Paa :PhoA. L'expression et le ciblage de la protéine hybride sont dirigés par *paa* via son promoteur et sa séquence signal. La quantité de phosphatase alcaline présente est dosable par une réaction colorimétrique, ce qui nous permet de quantifier indirectement la concentration de Paa produite selon différents milieux et conditions de culture. Cependant, pour être active et dosable, PhoA nécessite la formation de ponts disulfures par l'enzyme DsbA dans le périplasme. La possibilité de faire un dosage sous-entend que Paa est extracytoplasmique. La meilleure expression de la fusion Paa-PhoA a été retrouvée en milieu LB liquide à 37°C. Pourtant on observe que le meilleur ratio M155/86-1390 se retrouve en milieu LB à 30°C (Voir Annexe). Le ratio M155/86-1390 représente l'activité de M155 moins l'activité du témoin négatif 86-1390. On remarque aussi que malgré que ce soit le milieu LB qui donne une meilleure expression, celle-ci reste relativement faible. De plus, les dosages ont été

obtenus à partir des culots bactériens. Les surnageants de culture ont aussi été dosés, mais n'ont donné qu'une très faible expression de phosphatase alcaline et souvent après une très longue incubation avec le réactif. Le peu d'expression observée après les dosages de surnageant de culture semble dû à une contamination du surnageant par quelques débris bactériens. Donc, cette expérience nous permet de tirer une dernière conclusion: Paa n'est pas sécrété dans le surnageant de culture, mais est plutôt associée à la bactérie. Paa pourrait donc être périplasmique ou associée à la membrane externe.

L'expression plutôt faible de Paa, qui a été prédite théoriquement et aussi observée au laboratoire, autant par le dosage de la fusion Paa :PhoA que par la production dans des vecteurs d'expression, peut être expliquée de deux façons. Premièrement, la protéine est vraiment produite en faible quantité, peut-être à cause de son promoteur et de sa séquence -35 qui diffère du consensus, ce qui entraînerait une mauvaise fixation de l'ARN polymérase et une faible transcription d'ARN messager. Deuxièmement, la protéine pourrait être produite en grande quantité mais être ensuite dégradée rapidement, possiblement à cause d'une certaine instabilité située dans son N-terminal, comme nous l'a montré l'analyse bioinformatique. De façon intéressante, PEB3, l'homologue de Paa est instable à des températures supérieures à 4°C (Pei *et al.*, 1991).

#### **4. Création d'une souche mutante isogène pour le gène *paa***

Le mutant M155 était la seule souche mutante  $\Delta paa$ , d'où l'importance de créer une souche porcine mutante isogène pour le gène *paa* qui serait plus stable que le mutant *TnphoA*. Nous avons décidé de créer cette souche par échange allélique entre le gène sauvage et *paa* muté par l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine et cloné dans le vecteur suicide pKNG101 (Kaniga *et al.*, 1991) qui possède les gènes de résistance à la streptomycine ainsi que le gène *sacB* qui code pour la levansucrase, un enzyme sécrétée après l'induction par le sucrose. Chez *E. coli*, la production de levansucrase est létale en présence de 5% de sucrose dans l'agar, puisqu'elle cause la lyse des bactéries. Alors qu'une de nos stratégies a été fructueuse dans une souche REPEC, il a malheureusement été impossible d'obtenir une souche porcine mutante, malgré les différentes stratégies et vecteurs-suicide utilisés. Trois différentes stratégies ont été employées (Annexe 2). La première tentative avec *paa* du premier codon ATG au codon

stop laissait environ 400 pb de part et d'autre de l'insertion de la cassette kanamycine. Dans ce cas, le vecteur-suicide pKNG101 s'insérait bien dans le chromosome, mais pas au niveau de *paa*. Il semble donc qu'il y ait eu une meilleure homologie entre une partie du vecteur et le chromosome qu'entre le *paa* sauvage et mutant. Nos observations nous portent à croire qu'une première recombinaison se soit faite entre les gènes *strAB* du vecteur et le gène qui confère la résistance à la streptomycine à notre souche. Cette hypothèse n'a cependant pas été vérifiée.

Le fait que le vecteur suicide possède une résistance à la streptomycine et que notre souche soit déjà résistante à cet antibiotique ne nous permettait pas d'utiliser toutes les caractéristiques du vecteur-suicide pKNG101 (impossibilité de sélectionner pour la perte du vecteur en évaluant la perte de la résistance à la streptomycine de notre souche). À ce moment, nous avons choisi d'utiliser un autre vecteur suicide; pSW19 dont la sélection est basée sur une résistance au désoxycholate (Didier Mazel, Institut Pasteur), de façon à éviter l'homologie entre pKNG101 et le chromosome de notre souche. Comme deuxième stratégie, nous avons choisi de cloner dans le vecteur-suicide pSW19, un gène *paa* muté, toujours par l'insertion d'une cassette de résistance à la kanamycine, et tronqué de quelques codons en 5' et en 3' du gène. De cette façon, une seule recombinaison aurait été nécessaire pour obtenir une souche mutante, puisque aucune copie du gène sauvage n'aurait été recréée après l'insertion du vecteur-suicide dans le chromosome. Malheureusement, la construction pSW19(*paa::kan*) était trop instable pour être utilisée pour effectuer un échange allélique.

En troisième lieu, nous avons décidé de revenir à pKNG101. Cette fois, nous avons augmenté la longueur du gène *paa* muté de façon à ce que l'homologie entre le *paa* sauvage et le *paa* muté soit plus grande que celle entre la séquence du vecteur et celle du chromosome, pour éviter de se retrouver dans la situation de notre première stratégie. Nous avons donc gardé la construction de la première stratégie, mais en ajoutant 400 pb en 5' de *paa*. De cette façon, nous avons pu obtenir une première recombinaison au niveau du *paa* sauvage dans le chromosome. Malgré tous nos efforts, le deuxième événement de recombinaison nécessaire à l'excision du vecteur entraînant avec lui le gène sauvage ne semble pas avoir eu lieu. Plus de 500 clones ont été testés, mais aucun ne s'est avéré mutant. Il est difficile de s'avancer sur une cause de l'échec de cet échange allélique. La

souche utilisée possède bien un système de recombinaison homogène puisque la première recombinaison s'est bien produite au bon endroit.

Cependant cette dernière construction a permis à l'équipe du Dr Éric Oswald de réaliser un échange allélique dans une souche EPEC de lapin (souche E22 de sérotype O103:H2), et donc y créer une mutation  $\Delta paa$ . Cette souche mutée a ensuite été utilisée dans le modèle d'explants d'iléons de porcelets et a montré une adhérence réduite aux cellules épithéliales, confirmant ainsi que Paa est bien impliquée dans la pathogénèse de souches EPEC, et est probablement associée à l'adhérence.

## Conclusions

Paa est retrouvée chez des souches virulentes EHEC et EPEC, mais non chez les souches non-pathogènes. Chez deux souches EHEC, *paa* fait partie d'une région d'ADN spécifique aux souches EHEC et qui comprend certains gènes associés à la virulence. Cette région pourrait représenter un nouvel îlot de pathogénicité. Paa est impliquée dans la formation de lésions A/E, puisque lors de son absence, les lésions sont inhibées ou retardées.

Paa est une protéine hydrophile, associée à la bactérie et exprimée à sa surface. La protéine possède des homologues de séquences avec des protéines impliquées dans l'adhérence à une cellule-hôte. De plus, elle possède un domaine de liaison au sulfate retrouvé aussi chez des adhésines de plusieurs micro-organismes.

Paa semble instable et pourrait donc être exprimée de façon transitoire dans les premières étapes du mécanisme de pathogénèse des AEEC, puis serait dégradée lorsque son rôle est joué.

Il semble donc que Paa soit impliquée dans les premières étapes de la formation des lésions en participant probablement à l'adhésion de la bactérie aux entérocytes. Chez les AEEC, c'est l'intimine qui est surtout associée à l'adhérence intime à la cellule-hôte. Paa pourrait établir un premier contact avec la cellule-hôte, soit par un contact direct ou via la présence d'intermédiaires encore inconnus. Ce premier contact pourrait favoriser le rapprochement entre la bactérie et la cellule-hôte, avant que le filament EspA soit formé. Ou encore, Paa pourrait participer à la spécificité tissulaire bien variable chez les différentes AEEC.

## Perspectives

### Rôle dans l'adhésion

Paa semble être une adhésine, ce qui pourrait être confirmé en analysant l'association entre différentes concentrations de Paa marqué à la biotine et des cellules intestinales en culture, ou par colonne d'affinité avec des billes liées à du sulfate. Le ligand de Paa pourrait être une protéoglycane associée à du sulfate. Des lysats de cellules épithéliales intestinales pourraient être transférés sur membranes de nitrocellulose puis hybridées avec Paa marqué pour voir à quelle protéine (ou protéoglycane) elle se lierait («protein overlay assays»). Un test de FAS (Fluorescence Actin Staining) pourrait permettre de déterminer si la liaison entre Paa et son récepteur entraîne une transmission de signaux dans la cellule, comme la liaison Tir-intimine.

### Localisation du gène et de la protéine

Le gène *paa* semble faire partie d'un îlot de pathogénicité comme les autres gènes nécessaires à la formation de lésions AE. Y a-t-il un synchronisme entre l'expression de *paa* et celle des gènes du LEE? Il faudrait étudier l'influence des différents régulateurs du LEE sur la transcription de *paa* en introduisant un vecteur contenant une fusion transcriptionnelle avec un gène rapporteur (*phoA*, *lux* ou *gfp*) dans des souches mutantes pour ces facteurs de transcription, et en dosant du gène rapporteur, puis en procédant à une complémentation.

Les logiciels de bioinformatique utilisés prédisent que Paa est insérée en surface de la bactérie. Une centrifugation différentielle suivie d'un Western blot permettrait d'associer définitivement la protéine à un ou des compartiments cellulaires, puis une hybridation avec des anticorps anti-Paa marqués avec des billes d'or permettrait de localiser la protéine en microscopie électronique.

### Caractérisation du promoteur

Paa est instable *in vitro*, est-ce que son promoteur est assez fort pour diriger une bonne expression? Le promoteur pourrait être défini par cartographie à la nucléase S1 ou une extension d'amorce pour localiser le site d'initiation de la transcription. Par la suite, un

Northern blot permettrait d'évaluer la quantité d'ARN produit. La force du promoteur pourrait aussi être caractérisée par une fusion entre le promoteur de *paa* et *gfp* ou *lux*.

### **Distribution du gène**

Paa semble inséré à au moins deux différents endroits dans le chromosome des souches qui le possède. Il sera intéressant d'analyser les sites de localisation de *paa* dans ces différentes souches afin d'étudier la distribution du gène chez les différentes souches de *E. coli* pathogène.

### **Cible pour la vaccination**

Des anticorps anti-Paa bloquent l'adhésion des EPEC porcins aux cellules-hôtes lors d'infections expérimentales d'explants d'iléum de porcelets nouveaux-nés, est-ce qu'un vaccin ayant comme cible Paa serait efficace pour empêcher la formation de lésions AE *in vivo*? Des infections expérimentales de porcelets avec ou sans protection pour Paa seraient nécessaires pour vérifier cette hypothèse.



## Section IV: Annexes

## Annexe 1 : Expression de Paa

### Matériel et méthodes

#### **Dosage de la phosphatase alcaline**

L'expression de l'activité phosphatase alcaline médiée par le gène *paa::TnphoA* de la souche M155 a été dosée. Les souches M155 et 86-1390, servant de contrôle positif et négatif respectivement, ont été incubées à 37°C pendant 16h, en utilisant différentes conditions de culture. Les culots bactériens ainsi que les surnageants de culture ont été dilués dans du Tris-HCl pH 8,0 1M. Le taux d'hydrolyse du p-nitrophenyl phosphate (Sigma) catalysée par la phosphatase alcaline a été mesurée au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 420 nm (Michaelis, 1983). Les unités de phosphatase alcaline ont été calculées à partir de cette formule:

$$1000 \times [\text{OD}_{420 \text{ nm}} - 1.75 \times \text{OD}_{550 \text{ nm}}] / [\text{time (min)} \times \text{vol (ml)} \times \text{OD}_{600 \text{ nm}}]$$

### Résultats

La fusion *paa::phoA* chez la souche mutante M155 a permis de voir l'effet des conditions de croissance sur l'expression de *paa*. La souche sauvage 86-1390 a été utilisée comme contrôle négatif. Cette souche possède une faible activité phosphatase alcaline endogène. La meilleure expression de la fusion Paa-PhoA se fait en milieu LB liquide à 37°C, mais le meilleur ratio M155/86-1390, c'est à dire l'activité de M155 moins celle de 86-1390, se retrouve en LB à 30°C. La protéine de fusion Paa-PhoA semble associée à la bactérie puisque l'activité phosphatase alcaline des surnageants de culture était presque nulle.

## Annexe 1 (suite)

## Activité de la phosphatase alcaline

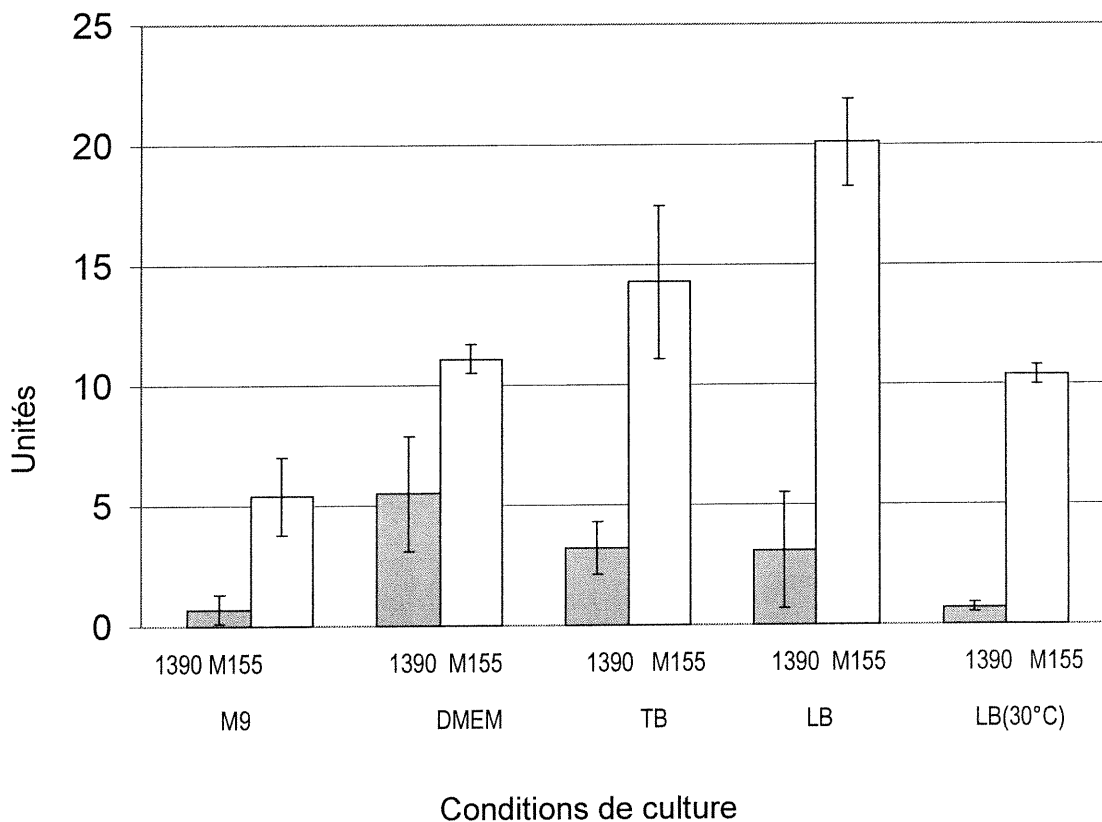


Figure 1: Effet de la culture en milieu liquide sur la production de phosphatase alcaline par les souches 86-1390 et M155. Les dosages ont été obtenus à partir de culots bactériens provenant de cultures sur la nuit. Les valeurs sur le graphique représentent la moyenne de trois dosages indépendants. Abréviations: M9: milieu minimal M9, DMEM: Dubelco Modified Eagle Media, TB: Tryptone Soy Broth, LB: Luria Bertani.

## Annexe 2

Les trois stratégies pour l'échange allélique




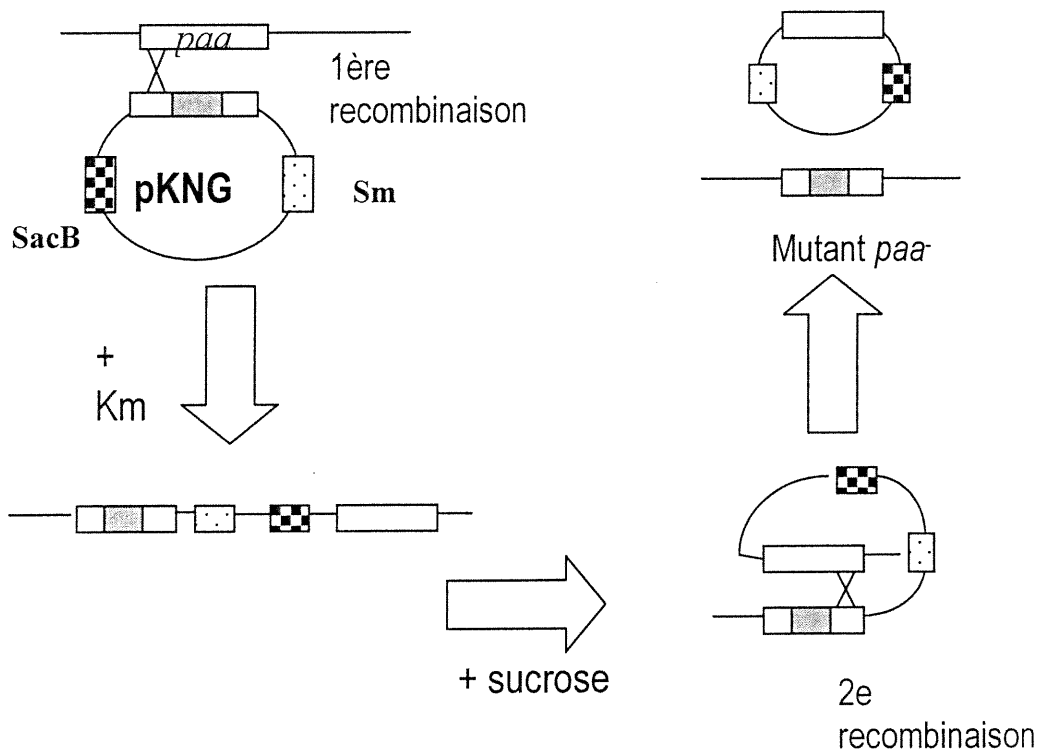
- 1)  *paa* du premier «atg» au «stop»  
1747 pb
- 2)  *paa* (stratégie 1) tronqué; une recombinaison suffirait  
1729 pb
- 3)  *paa* (stratégie 1) plus le promoteur  
2305 pb

Schéma de l'échange allélique

## SECTION V: Bibliographie

- Abe, A., Kenny, B., Stein, M., and Finlay, B.B. (1997) Characterization of two virulence proteins secreted by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*, EspA and EspB, whose maximal expression is sensitive to host body temperature. *Infection and Immunity* **65**: 3547-3555.
- Abe, A., Heczko, U., Hegele, R.G., and Brett Finlay, B. (1998) Two enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted proteins, EspA and EspB, are virulence factors. *Journal of Experimental Medicine* **188**: 1907-1916.
- Abe, A., de Grado, M., Pfuetzner, R.A., Sanchez-Sanmartin, C., Devinney, R., Puente, J.L., Strynadka, N.C., and Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, requires a specific chaperone for stable secretion. *Molecular Microbiology* **33**: 1162-1175.
- Adam, T., Arpin, M., Prevost, M.C., Gounon, P., and Sansonetti, P.J. (1995) Cytoskeletal rearrangements and the functional role of T-plastin during entry of *Shigella flexneri* into HeLa cells. *J Cell Biol* **129**: 367-381.
- Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A.G., Trabulsi, L.R., Douce, G., Knutton, S., and Dougan, G. (1998) Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J Clin Microbiol* **36**: 662-668.
- Agin, T.S., and Wolf, M.K. (1997) Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans, and swine. *infection and immunity* **65**: 320-326.
- Ahmer, B.M., van Reeuwijk, J., Timmers, C.D., Valentine, P.J., and Heffron, F. (1998) *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J Bacteriol* **180**: 1185-1193.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D. (1994) *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing.
- Aldea, M., Garrido, T., Pla, J., and Vicente, M. (1990) Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters. *EMBO J* **9**: 3787-3794.
- An, H., Fairbrother, J.M., Dubreuil, J.D., and 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.
- An, H. (1998) Genetic analysis of virulence determinants of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from pig and dog. In *Department of Microbiology and Immunology* Montréal: Université de Montréal, pp. 1998.
- An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., and Harel, J. (1999) Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **473**: 179-184.
- An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Mabrouk, T., Dugourd, D., Dezfoulian, H., and Harel, J. (2000) Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb Pathog* **28**: 291-300.
- Anantha, R.P., Stone, K.D., and Donnenberg, M.S. (2000) Effects of *bfp* mutations on biogenesis of functional enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pili. *J Bacteriol* **182**: 2498-2506.

- Anderson, D.M., and Schneewind, O. (1999) Type III machines of Gram-negative pathogens: injecting virulence factors into host cells and more. *Curr Opin Microbiol* **2**: 18-24.
- Araki, N., Johnson, M.T., and Swanson, J.A. (1996) A role for phosphoinositide 3-kinase in the completion of macropinocytosis and phagocytosis by macrophages. *J Cell Biol* **135**: 1249-1260.
- Ball, C.A., Osuna, R., Ferguson, K.C., and Johnson, R.C. (1992) Dramatic changes in Fis levels upon nutrient upshift in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **174**: 8043-8056.
- Barondess, J.J., and Beckwith, J. (1990) A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature* **346**: 871-874.
- Batchelor, M., Prasanna, S., Daniell, S., Reece, S., Connerton, I., Bloomberg, G., Dougan, G., Frankel, G., and Matthews, S. (2000) Structural basis for recognition of the translocated intimin receptor (Tir) by intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *EMBO J* **19**: 2452-2464.
- Beaudry, M. (1995) Caractérisation moléculaire et phénotypique des souches d'*Escherichia coli* provenant d'isolats de chiens ayant des lésions de type attachant et effaçant.: Université de Montréal.
- Beaudry, M., Zhu, C., Fairbrother, J.M., and Harel, J. (1996) Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**: 144-148.
- Beaulieu, J.F. (1992) Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* **102**: 427-436.
- Beltrametti, F., Kresse, A.U., and Guzman, C.A. (1999) Transcriptional regulation of the esp genes of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **181**: 3409-3418.
- Bennett, J.C., and Hughes, C. (2000) From flagellum assembly to virulence: the extended family of type III export chaperones. *Trends Microbiol* **8**: 202-204.
- Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y., Murray, W.J., Tobe, T., Fernandez, R., and Schoolnik, G.K. (1998) Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli* [see comments]. *Science* **280**: 2114-2118.
- Blattner, F.R., Plunkett, G., 3rd, Bloch, C.A., Perna, N.T., Burland, V., Riley, M., Collado-Vides, J., Glasner, J.D., Rode, C.K., Mayhew, G.F., Gregor, J., Davis, N.W., Kirkpatrick, H.A., Goeden, M.A., Rose, D.J., Mau, B., and Shao, Y. (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**: 1453-1474.
- Blocker, A., Jouihri, N., Larquet, E., Gounon, P., Ebel, F., Parsot, C., Sansonetti, P., and Allaoui, A. (2001) Structure and composition of the *Shigella flexneri* "needle complex", a part of its type III secretin. *Mol Microbiol* **39**: 652-663.
- Bokal, A.J., Ross, W., Gaal, T., Johnson, R.C., and Gourse, R.L. (1997) Molecular anatomy of a transcription activation patch: FIS-RNA polymerase interactions at the *Escherichia coli* *rrnB* P1 promoter. *EMBO J* **16**: 154-162.
- Broes, A., Drolet, R., Jacques, M., Fairbrother, J.M., and Johnson, W.M. (1988) Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. *Can J Vet Res* **52**: 280-282.
- Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. (1998) Analysis of cis-acting elements required for *bfpA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **180**: 3013-3016.

- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., and Puente, J.L. (2001) Transcriptional regulation of type III secretion genes in EPEC: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* **39**(3): 664-678.
- Canil, C., Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B. (1993) Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect Immun* **61**: 2755-2762.
- Cantey, J.R., and Blake, R.K. (1977) Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis* **135**: 454-462.
- Celli, J., Olivier, M., and Finlay, B.B. (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways. *EMBO J* **20**: 1245-1258.
- Chen, J.C., Zhang, J.P., and Stephens, R.S. (1996) Structural requirements of heparin binding to *Chlamydia trachomatis*. *J Biol Chem* **271**: 11134-11140.
- Chmiela, M., Czkwianianc, E., Wadstrom, T., and Rudnicka, W. (1997) Role of *Helicobacter pylori* surface structures in bacterial interaction with macrophages. *Gut* **40**: 20-24.
- Cid, D., Ruiz-Santa-Quiteria, J.A., Marin, I., Sanz, R., Orden, J.A., Amils, R., and de La Fuente, R. (2001) Association between intimin (*eae*) and EspB gene subtypes in attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from diarrhoeic lambs and goat kids. *Microbiology* **147**: 2341-2353.
- Clark, M.A., Hirst, B.H., and Jepson, M.A. (1998) M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**: 1237-1243.
- Clarke, S.C. (2001) Diarrhoeagenic *Escherichia coli*-an emerging problem? *Diagn Microbiol Infect Dis* **41**: 93-98.
- Collington, G.K., Booth, I.W., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Knutton, S. (1998a) Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes encoding secreted signalling proteins are essential for modulation of Caco-2 cell electrolyte transport. *Infect Immun* **66**: 6049-6053.
- Collington, G.K., Booth, I.W., and Knutton, S. (1998b) Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection. *Gut* **42**: 200-207.
- Cornelis, G.R., Boland, A., Boyd, A.P., Geuijen, C., Iriarte, M., Neyt, C., Sory, M.P., and Stainier, I. (1998) The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 1315-1352.
- Crane, J.K., and Oh, J.S. (1997) Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**: 3277-3285.
- Crane, J.K., Majumdar, S., and Pickhardt, D.F., 3rd (1999) Host cell death due to enteropathogenic *Escherichia coli* has features of apoptosis. *Infect Immun* **67**: 2575-2584.
- Crane, J.K., McNamara, B.P., and Donnenberg, M.S. (2001) Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 197-211.
- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., and Rowe, B. (1979) An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* **3**: 95-99.



- Czczulin, J.R., Balepur, S., Hicks, S., Phillips, A., Hall, R., Kothary, M.H., Navarro-Garcia, F., and Nataro, J.P. (1997) Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**: 4135-4145.
- Czerucka, D., Dahan, S., Mograbi, B., Rossi, B., and Rampal, P. (2001) Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **69**: 1298-1305.
- Daniell, S.J., Takahashi, N., Wilson, R., Friedberg, D., Rosenshine, I., Booy, F.P., Shaw, R.K., Knutton, S., Frankel, G., and Aizawa, S.I. (2001) The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 865-871.
- De Biase, D., Tramonti, A., Bossa, F., and Visca, P. (1999) The response to stationary-phase stress conditions in *Escherichia coli*: role and regulation of the glutamic acid decarboxylase system. *Mol Microbiol* **32**: 1198-1211.
- de Grado, M., Abe, A., Gauthier, A., Steele-Mortimer, O., DeVinney, R., and Finlay, B.B. (1999) Identification of the intimin-binding domain of Tir of EPEC. *Cellul Microbiol* **1**: 7-17.
- de Grado, M., Rosenberger, C.M., Gauthier, A., Vallance, B.A., and Finlay, B.B. (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. *Infect Immun* **69**: 6217-6224.
- de Verdugo, U.R., Selinka, H.C., Huber, M., Kramer, B., Kellermann, J., Hofschneider, P.H., and Kandolf, R. (1995) Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J Virol* **69**: 6751-6757.
- de Vries, F.P., Cole, R., Dankert, J., Frosch, M., and van Putten, J.P. (1998) *Neisseria meningitidis* producing the Opc adhesin binds epithelial cell proteoglycan receptors. *Mol Microbiol* **27**: 1203-1212.
- Deibel, C., Kramer, S., Chakraborty, T., and Ebel, F. (1998) EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol Microbiol* **28**: 463-474.
- Deibel, C., Dersch, P., and Ebel, F. (2001) Intimin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its isolated C-terminal domain exhibit different binding properties for Tir and a eukaryotic surface receptor. *Int J Med Microbiol* **290**: 683-691.
- Delahay, R.M., Knutton, S., Shaw, R.K., Hartland, E.L., Pallen, M.J., and Frankel, G. (1999) The coiled-coil domain of EspA is essential for the assembly of the type III secretion translocon on the surface of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **274**: 35969-35974.
- Delahay, R.M., Shaw, R.K., Elliott, S.J., Kaper, J.B., Knutton, S., and Frankel, G. (2002) Functional analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system chaperone CesT identifies domains that mediate substrate interactions. *Mol Microbiol* **43**: 61-73.
- Demers, B., Sansonetti, P.J., and Parsot, C. (1998) Induction of type III secretion in *Shigella flexneri* is associated with differential control of transcription of genes encoding secreted proteins. *EMBO J* **17**: 2894-2903.

- DeVinney, R., Gauthier, A., Abe, A., and Finlay, B.B. (1999a) Enteropathogenic *Escherichia coli*: a pathogen that inserts its own receptor into host cells. *Cellular and Molecular Life Sciences* **55**: 961-976.
- DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Abe, A., Ruschkowski, S., and Finlay, B.B. (1999b) Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect Immun* **67**: 2389-2398.
- DeVinney, R., Puente, J.L., Gauthier, A., Goosney, D., and Finlay, B.B. (2001) Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use a different Tir-based mechanism for pedestal formation. *Mol Microbiol* **41**: 1445-1458.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1991) Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**: 4310-4317.
- Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1992) Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**: 3953-3961.
- Donnenberg, M.S., Tacket, C.O., James, S.P., Losonsky, G., Nataro, J.P., Wasserman, S.S., Kaper, J.B., and Levine, M.M. (1993a) Role of the *eaeA* gene in experimental enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *J Clin Invest* **92**: 1412-1417.
- Donnenberg, M.S., Yu, J., and Kaper, J.B. (1993b) A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 4670-4680.
- Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B. (1997a) Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* **5**: 109-114.
- Donnenberg, M.S., Lai, L.C., and Taylor, K.A. (1997b) The locus of enterocyte effacement pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes secretion functions and remnants of transposons at its extreme right end. *Gene* **184**: 107-114.
- Donnenberg, M.S., and Whittam, T.S. (2001) Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Clin Invest* **107**: 539-548.
- Dreyfus, L.A., Harville, B., Howard, D.E., Shaban, R., Beatty, D.M., and Morris, S.J. (1993) Calcium influx mediated by the *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin B (STB). *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 3202-3206.
- Duensing, T.D., Wing, J.S., and van Putten, J.P. (1999) Sulfated polysaccharide-directed recruitment of mammalian host proteins: a novel strategy in microbial pathogenesis. *Infect Immun* **67**: 4463-4468.
- Ebel, F., Deibel, C., Kresse, A.U., Guzman, C.A., and Chakraborty, T. (1996) Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **64**: 4472-4479.
- Elliott, S.J., Wainwright, L.A., McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Deng, Y.K., Lai, L.C., McNamara, B.P., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1998) The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**: 1-4.
- Elliott, S.J., Hutcheson, S.W., Dubois, M.S., Mellies, J.L., Wainwright, L.A., Batchelor, M., Frankel, G., Knutton, S., and Kaper, J.B. (1999a) Identification of CesT, a

- chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 1176-1189.
- Elliott, S.J., Yu, J., and Kaper, J.B. (1999b) The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect Immun* **67**: 4260-4263.
- Elliott, S.J., Sperandio, V., Giron, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Wainwright, L., Hutcheson, S.W., McDaniel, T.K., and Kaper, J.B. (2000) The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**: 6115-6126.
- Elliott, S.J., Krejany, E.O., Mellies, J.L., Robins-Browne, R.M., Sasakawa, C., and Kaper, J.B. (2001) EspG, a Novel Type III System-Secreted Protein from Enteropathogenic *Escherichia coli* with Similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **69**: 4027-4033.
- Fairbrother, J.M. (1992) Enteric colibacillosis. In *Diseases of swine*. Leman, A.D., Straw, B.E., Mengeling, W.L., D'Allaire, S. and Taylor, D.J. (eds): Iowa State University Press, pp. 489-497.
- Farris, M., Grant, A., Richardson, T.B., and O'Connor, C.D. (1998) BipA: a tyrosine-phosphorylated GTPase that mediates interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells. *Mol Microbiol* **28**: 265-279.
- Filipenko, N.R., and Waisman, D.M. (2001) The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* **276**: 5310-5315.
- Finlay, B.B., Rosenshine, I., Sonnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1992) Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun* **60**: 2541-2543.
- Finlay, B.B., and Falkow, S. (1997) Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 136-169.
- Fivaz, M., and van der Goot, F.G. (1999) The tip of a molecular syringe. *Trends Microbiol* **7**: 341-343.
- Foubister, V., Rosenshine, I., Sonnenberg, M.S., and Finlay, B.B. (1994) The *eaeb* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 3038-3040.
- Frankel, G., Candy, D.C., Everest, P., and Dougan, G. (1994) Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* **62**: 1835-1842.
- Frankel, G., Candy, D.C., Fabiani, E., Adu-Bobie, J., Gil, S., Novakova, M., Phillips, A.D., and Dougan, G. (1995) Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 4323-4328.
- Frankel, G., Lider, O., Hershkoviz, R., Mould, A.P., Kachalsky, S.G., Candy, D.C.A., Cahalon, L., Humphries, M.J., and Dougan, G. (1996) The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* **271**: 20359-20364.

- Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B., and Knutton, S. (1998) Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**: 911-921.
- Freeman, N.L., Zurawski, D.V., Chowrashi, P., Ayoob, J.C., Huang, L., Mittal, B., Sanger, J.M., and Sanger, J.W. (2000) Interaction of the enteropathogenic *Escherichia coli* protein, translocated intimin receptor (Tir), with focal adhesion proteins. *Cell Motil Cytoskeleton* **47**: 307-318.
- Freestone, P., Trinei, M., Clarke, S.C., Nystrom, T., and Norris, V. (1998) Tyrosine phosphorylation in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **279**: 1045-1051.
- Friedberg, D., Umanski, T., Fang, Y., and Rosenshine, I. (1999) Hierarchy in the expression of the locus of enterocyte effacement genes of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **34**: 941-952.
- Friedman, D.I. (1988) Integration host factor: a protein for all reasons. *Cell* **55**: 545-554.
- Fujii, Y., Nomura, T., Yamanaka, H., and Okamoto, K. (1997) Involvement of Ca(2+)-calmodulin-dependent protein kinase II in the intestinal secretory action of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Microbiol Immunol* **41**: 633-636.
- Galan, J.E., and Collmer, A. (1999) Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. *Science* **284**: 1322-1328.
- Gallegos, M.T., Schleif, R., Bairoch, A., Hofmann, K., and Ramos, J.L. (1997) Arac/XylS family of transcriptional regulators. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**: 393-410.
- Gauthier, A., de Grado, M., and Finlay, B.B. (2000) Mechanical fractionation reveals structural requirements for enteropathogenic *Escherichia coli* Tir insertion into host membranes. *Infect Immun* **68**: 4344-4348.
- Gerke, V., and Moss, S.E. (1997) Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1357**: 129-154.
- Gille, H., Egan, J.B., Roth, A., and Messer, W. (1991) The FIS protein binds and bends the origin of chromosomal DNA replication, oriC, of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **19**: 4167-4172.
- Ginisty, H., Sicard, H., Roger, B., and Bouvet, P. (1999) Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112**: 761-772.
- Ginocchio, C.C., Olmsted, S.B., Wells, C.L., and Galan, J.E. (1994) Contact with epithelial cells induces the formation of surface appendages on *Salmonella typhimurium*. *Cell* **76**: 717-724.
- Giron, J.A., Ho, A.S., and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**: 710-713.
- Goldberg, M.D., Johnson, M., Hinton, J.C., and Williams, P.H. (2001) Role of the nucleoid-associated protein Fis in the regulation of virulence properties of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **41**: 549-559.
- Gomez-Duarte, O.G., and Kaper, J.B. (1995) A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1767-1776.
- Gonzalez-Gil, G., Bringmann, P., and Kahmann, R. (1996) FIS is a regulator of metabolism in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **22**: 21-29.
- Goosen, N., and van de Putte, P. (1995) The regulation of transcription initiation by integration host factor. *Mol Microbiol* **16**: 1-7.

- Goosney, D.L., Celli, J., Kenny, B., and Finlay, B.B. (1999) Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits phagocytosis. *infection and immunity* **67**: 490-495.
- Goosney, D.L., DeVinney, R., Pfuetzner, R.A., Frey, E.A., Strynadka, N.C., and Finlay, B.B. (2000a) Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr Biol* **10**: 735-738.
- Goosney, D.L., Gruenheid, S., and Finlay, B.B. (2000b) GUT FEELINGS: Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Interactions with the Host. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**: 173-189.
- Goosney, D.L., DeVinney, R., and Finlay, B.B. (2001) Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun* **69**: 3315-3322.
- Gruenheid, S., DeVinney, R., Blatt, F., Goosney, D., Gelkop, S., Gish, G.D., Pawson, T., and Finlay, B.B. (2001) Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* **3**: 856-859.
- Hacker, J., and Kaper, J.B. (2000) Pathogenicity Islands and the Evolution of Microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**: 641-679.
- Hakansson, S., Bergman, T., Vanooteghem, J.C., Cornelis, G., and Wolf-Watz, H. (1993) YopB and YopD constitute a novel class of *Yersinia* Yop proteins. *Infect Immun* **61**: 71-80.
- Hakansson, S., Schesser, K., Persson, C., Galyov, E.E., Rosqvist, R., Homble, F., and Wolf-Watz, H. (1996) The YopB protein of *Yersinia pseudotuberculosis* is essential for the translocation of Yop effector proteins across the target cell plasma membrane and displays a contact-dependent membrane disrupting activity. *EMBO J* **15**: 5812-5823.
- Harkey, C.W., Everiss, K.D., and Peterson, K.M. (1995) Isolation and characterization of a *Vibrio cholerae* gene (*tagA*) that encodes a ToxR-regulated lipoprotein. *Gene* **153**: 81-84.
- Hartland, E.L., Batchelor, M., Delahay, R.M., Hale, C., Matthews, S., Dougan, G., Knutton, S., Connerton, I., and Frankel, G. (1999) Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol* **32**: 151-158.
- Hartland, E.L., Daniell, S.J., Delahay, R.M., Neves, B.C., Wallis, T., Shaw, R.K., Hale, C., Knutton, S., and Frankel, G. (2000a) The type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli* involves EspA-EspB protein interactions. *Mol Microbiol* **35**: 1483-1492.
- Hartland, E.L., Huter, V., Higgins, L.M., Goncalves, N.S., Dougan, G., Phillips, A.D., MacDonald, T.T., and Frankel, G. (2000b) Expression of intimin gamma from enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **68**: 4637-4646.
- Hayashi, T., Makino, K., Ohnishi, M., Kurokawa, K., Ishii, K., Yokoyama, K., Han, C.G., Ohtsubo, E., Nakayama, K., Murata, T., Tanaka, M., Tobe, T., Iida, T., Takami, H., Honda, T., Sasakawa, C., Ogasawara, N., Yasunaga, T., Kuhara, S., Shiba, T., Hattori, M., and Shinagawa, H. (2001) Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**: 11-22.

- Hecht, G., and Koutsouris, A. (1999) Enteropathogenic *E. coli* attenuates secretagogue-induced net intestinal ion transport but not Cl<sup>-</sup> secretion. *Am J Physiol* **276**: G781-788.
- Hecht, G. (2001) VII. Enteropathogenic *Escherichia coli*: physiological alterations from an extracellular position. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **281**: G1-7.
- Helie, P., Morin, M., Jacques, M., and Fairbrother, J.M. (1991) Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infect Immun* **59**: 814-821.
- Henderson, I.R., and Nataro, J.P. (2001) Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**: 1231-1243.
- Hicks, S., Frankel, G., Kaper, J.B., Dougan, G., and Phillips, A.D. (1998) Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue in vitro. *Infect Immun* **66**: 1570-1578.
- Hueck, C.J. (1998) Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**: 379-433.
- Ide, T., Laarmann, S., Greune, L., Schillers, H., Oberleithner, H., and Schmidt, M.A. (2001) Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 669-679.
- Ilan, O., Bloch, Y., Frankel, G., Ullrich, H., Geider, K., and Rosenshine, I. (1999) Protein tyrosine kinases in bacterial pathogens are associated with virulence and production of exopolysaccharide. *EMBO J* **18**: 3241-3248.
- Isberg, R.R., and Dumenil, G. (2001) Delivering dangerous cargoes. *Nat Struct Biol* **8**: 1006-1008.
- Ismaili, A., Philpott, D.J., Dytoc, M.T., and Sherman, P.M. (1995) Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 3316-3326.
- Janke, B.H., Francis, D.H., Collins, J.E., Libal, M.C., Zeman, D.H., and Johnson, D.D. (1989) Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Invest* **1**: 6-11.
- Jarvis, K.G., Giron, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7996-8000.
- Jerse, A.E., Yu, J., Tall, B.D., and Kaper, J.B. (1990) A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**: 7839-7843.
- Jerse, A.E., and Kaper, J.B. (1991) The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun* **59**: 4302-4309.
- Kalman, D., Weiner, O.D., Goosney, D.L., Sedat, J.W., Finlay, B.B., Abo, A., and Bishop, J.M. (1999) Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol* **1**: 389-391.
- Kanamaru, K., Tatsuno, I., Tobe, T., and Sasakawa, C. (2000) SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence

- factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **38**: 805-816.
- Kaniga, K., Delor, I., and Cornelis, G.R. (1991) A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**: 137-141.
- Kaper, J. (1994) Molecular Pathogenesis of Enteropathogenic *Escherichia coli*. In *Molecular Genetics of Bacterial Pathogenesis*. Miller, V., Kaper, J., Portnoy, D. and Isberg, R. (eds). Washington: American Society for Microbiology, pp. 173-195.
- Karaolis, D.K., Johnson, J.A., Bailey, C.C., Boedeker, E.C., Kaper, J.B., and Reeves, P.R. (1998) A *Vibrio cholerae* pathogenicity island associated with epidemic and pandemic strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3134-3139.
- Kelly, G., Prasannan, S., Daniell, S., Fleming, K., Frankel, G., Dougan, G., Connerton, I., and Matthews, S. (1999) Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**: 313-318.
- Kenny, B., and Finlay, B.B. (1995) Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 7991-7995.
- Kenny, B., Abe, A., Stein, M., and Finlay, B.B. (1997a) Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infection and Immunity* **65**: 2606-2612.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D.J., Frey, E.A., and Finlay, B.B. (1997b) Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.
- Kenny, B., and Finlay, B.B. (1997) Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. *Infect Immun* **65**: 2528-2536.
- Kenny, B. (1999) Phosphorylation of tyrosine 474 of the enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule is essential for actin nucleating activity and is preceded by additional host modifications. *Mol Microbiol* **31**: 1229-1241.
- Kenny, B., and Jepson, M. (2000) Targeting of an EPEC effector protein to host mitochondria. *Cellular Microbiology* **2**: 579-590.
- Kenny, B. (2001) The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O157:H7) Tir molecule is not functionally interchangeable for its enteropathogenic *E. coli* (serotype O127:H6) homologue. *Cell Microbiol* **3**: 499-510.
- Kenny, B., and Warawa, J. (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir receptor molecule does not undergo full modification when introduced into host cells by EPEC-independent mechanisms. *Infect Immun* **69**: 1444-1453.
- Kimbrough, T.G., and Miller, S.I. (2000) Contribution of *Salmonella typhimurium* type III secretion components to needle complex formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 11008-11013.
- Knutton, S., Lloyd, D.R., and McNeish, A.S. (1987) Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* **55**: 69-77.
- Knutton, S., Adu-Bobie, J., Bain, C., Phillips, A.D., Dougan, G., and Frankel, G. (1997) Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun* **65**: 1644-1652.

- Knutton, S., Rosenshine, I., Pallen, M.J., Nisan, I., Neves, B.C., Bain, C., Wolff, C., Dougan, G., and Frankel, G. (1998) A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**: 2166-2176.
- Knutton, S., Shaw, R.K., Anantha, R.P., Donnenberg, M.S., and Zorgani, A.A. (1999) The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* **33**: 499-509.
- Kresse, A.U., Rohde, M., and Guzman, C.A. (1999) The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infect Immun* **67**: 4834-4842.
- Kubori, T., Matsushima, Y., Nakamura, D., Uralil, J., Lara-Tejero, M., Sukhan, A., Galan, J.E., and Aizawa, S.I. (1998) Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* **280**: 602-605.
- Kubori, T., Sukhan, A., Aizawa, S.I., and Galan, J.E. (2000) Molecular characterization and assembly of the needle complex of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 10225-10230.
- Lacasse, D. (1995) *Introduction à la microbiologie alimentaire*. Montréal: Éditions St-Martin.
- Lai, L.C., Wainwright, L.A., Stone, K.D., and 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**: 2211-2217.
- Levine, M.M., Nataro, J.P., Karch, H., Baldini, M.M., Kaper, J.B., Black, R.E., Clements, M.L., and O'Brien, A.D. (1985) The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**: 550-559.
- Lloyd, S.A., Norman, M., Rosqvist, R., and Wolf-Watz, H. (2001) *Yersinia* YopE is targeted for type III secretion by N-terminal, not mRNA, signals. *Mol Microbiol* **39**: 520-531.
- Lloyd, S.A., Sjostrom, M., Andersson, S., and Wolf-Watz, H. (2002) Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences. *Mol Microbiol* **43**: 51-59.
- Luo, Y., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Creagh, A.L., Knoechel, D.G., Haynes, C.A., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C. (2000) Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**: 1073-1077.
- Luo, Y., Bertero, M.G., Frey, E.A., Pfuetzner, R.A., Wenk, M.R., Creagh, L., Marcus, S.L., Lim, D., Sicheri, F., Kay, C., Haynes, C., Finlay, B.B., and Strynadka, N.C. (2001) Structural and biochemical characterization of the type III secretion chaperones CesT and SigE. *Nat Struct Biol* **8**: 1031-1036.
- Manjarrez-Hernandez, H.A., Baldwin, T.J., Williams, P.H., Haigh, R., Knutson, S., and Aitken, A. (1996) Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **64**: 2368-2370.



- Mansfield, K.G., Lin, K.C., Xia, D., Newman, J.V., Schauer, D.B., MacKey, J., Lackner, A.A., and Carville, A. (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* and Ulcerative Colitis in Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*). *J Infect Dis* **184**: 803-807.
- Martinez-Laguna, Y., Calva, E., and Puente, J.L. (1999) Autoactivation and environmental regulation of *bfpT* expression, the gene coding for the transcriptional activator of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**: 153-166.
- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Sonnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1995) A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 1664-1668.
- McDaniel, T.K., and 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.
- McNamara, B.P., and Sonnenberg, M.S. (1998) A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett* **166**: 71-78.
- McNamara, B.P., and Sonnenberg, M.S. (2000) Evidence for specificity in type 4 pilus biogenesis by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* **146**: 719-729.
- McNamara, B.P., Koutsouris, A., O'Connell, C.B., Nougayrede, J.P., Sonnenberg, M.S., and Hecht, G. (2001) Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest* **107**: 621-629.
- Mellies, J.L., Elliott, S.J., Sperandio, V., Sonnenberg, M.S., and Kaper, J.B. (1999) The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli* : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol* **33**: 296-306.
- Mellies, J.L., Navarro-Garcia, F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (2001) *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* **69**: 315-324.
- Menard, R., Sansonetti, P., Parsot, C., and Vasselon, T. (1994) Extracellular association and cytoplasmic partitioning of the IpaB and IpaC invasins of *S. flexneri*. *Cell* **79**: 515-525.
- Michael, B., Smith, J.N., Swift, S., Heffron, F., and Ahmer, B.M. (2001) SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* **183**: 5733-5742.
- Michaelis, S., Inouye, H., Oliver, D., Beckwith, J. (1983) Mutations that alter the signal sequence of alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **154**: 366-374.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., and Giannella, R.A. (1983) Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**: 1340-1351.
- Moxley, R.A., and Francis, D.H. (1986) Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun* **53**: 339-346.
- Mullins, R.D., Heuser, J.A., and Pollard, T.D. (1998) The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6181-6186.

- Munson, G.P., Holcomb, L.G., and Scott, J.R. (2001) Novel group of virulence activators within the AraC family that are not restricted to upstream binding sites. *Infect Immun* **69**: 186-193.
- Nataro, J.P., and Kaper, J.B. (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli* [published erratum appears in Clin Microbiol Rev 1998 Apr;11(2):403]. *Clin Microbiol Rev* **11**: 142-201.
- Nataro, J.P., Steiner, T., and Guerrant, R.L. (1998) Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis* **4**: 251-261.
- Nealson, K.H., Platt, T., and Hastings, J.W. (1970) Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**: 313-322.
- Neves, B.C., Knutton, S., Trabulsi, L.R., Sperandio, V., Kaper, J.B., Dougan, G., and Frankel, G. (1998) Molecular and ultrastructural characterisation of EspA from different enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 73-80.
- Ohnishi, M., Kurokawa, K., and Hayashi, T. (2001) Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol* **9**: 481-485.
- Okeke, I.N., Borneman, J.A., Shin, S., Mellies, J.L., Quinn, L.E., and Kaper, J.B. (2001) Comparative Sequence Analysis of the Plasmid-Encoded Regulator of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains. *Infect Immun* **69**: 5553-5564.
- Orrick, L.R., Olson, M.O., and Busch, H. (1973) Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**: 1316-1320.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., and Caprioli, A. (2000) Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* **68**: 64-71.
- Pallen, M.J., Dougan, G., and Frankel, G. (1997) Coiled-coil domains in proteins secreted by type III secretion systems [letter]. *Mol Microbiol* **25**: 423-425.
- Pan, C.Q., Finkel, S.E., Cramton, S.E., Feng, J.A., Sigman, D.S., and Johnson, R.C. (1996) Variable structures of Fis-DNA complexes determined by flanking DNA- protein contacts. *J Mol Biol* **264**: 675-695.
- Parsot, C., and Mekalanos, J.J. (1992) Structural analysis of the *acfA* and *acfD* genes of *Vibrio cholerae*: effects of DNA topology and transcriptional activators on expression. *J Bacteriol* **174**: 5211-5218.
- Paton, A.W., Manning, P.A., Woodrow, M.C., and Paton, J.C. (1998) Translocated intimin receptors (Tir) of Shiga-toxigenic *Escherichia coli* isolates belonging to serogroups O26, O111, and O157 react with sera from patients with hemolytic-uremic syndrome and exhibit marked sequence heterogeneity. *Infect Immun* **66**: 5580-5586.
- Paton, J.C., and Paton, A.W. (1998) Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Clin Microbiol Rev* **11**: 450-479.
- Pei, Z.H., Ellison, R.T.d., and Blaser, M.J. (1991) Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* **266**: 16363-16369.
- Perna, N.T., Mayhew, G.F., Posfai, G., Elliott, S., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Blattner, F.R. (1998) Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **66**: 3810-3817.

- Perna, N.T., Plunkett, G., Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., and Blattner, F.R. (2001) Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**: 529-533.
- Peterson, J.W., and Whipp, S.C. (1995) Comparison of the mechanisms of action of cholera toxin and the heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 1452-1461.
- Peterson, K.M., and Mekalanos, J.J. (1988) Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization [published erratum appears in *Infect Immun* 1989 Feb;57(2):660]. *Infect Immun* **56**: 2822-2829.
- Phillips, A.D. (1998) The medium is the messenger. *Gut* **43**: 456-457.
- Phillips, A.D., and Frankel, G. (2000) Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**: 1496-1500.
- Phillips, A.D., Navabpour, S., Hicks, S., Dougan, G., Wallis, T., and Frankel, G. (2000) Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* **47**: 377-381.
- Plotkowski, M.C., Costa, A.O., Morandi, V., Barbosa, H.S., Nader, H.B., de Bentzmann, S., and Puchelle, E. (2001) Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. *J Med Microbiol* **50**: 183-190.
- Qi, S.Y., Li, Y., Szyroki, A., Giles, I.G., Moir, A., and O'Connor, C.D. (1995) *Salmonella typhimurium* responses to a bactericidal protein from human neutrophils. *Mol Microbiol* **17**: 523-531.
- Rabinowitz, R.P., Lai, L.C., Jarvis, K., McDaniel, T.K., Kaper, J.B., Stone, K.D., and Donnenberg, M.S. (1996) Attaching and effacing of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli* in the absence of detectable tyrosine kinase mediated signal transduction. *Microb Pathog* **21**: 157-171.
- Reece, S., Simmons, C.P., Fitzhenry, R.J., Matthews, S., Phillips, A.D., Dougan, G., and Frankel, G. (2001) Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity. *Mol Microbiol* **40**: 86-98.
- Rosenshine, I., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., and Finlay, B.B. (1992) Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J* **11**: 3551-3560.
- Rosenshine, I., Ruschkowski, S., Stein, M., Reinscheid, D.J., Mills, S.D., and Finlay, B.B. (1996) A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* **15**: 2613-2624.
- Rosqvist, R., Hakansson, S., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1995) Functional conservation of the secretion and translocation machinery for virulence proteins of yersiniae, salmonellae and shigellae. *EMBO J* **14**: 4187-4195.

- Rostand, K.S., and Esko, J.D. (1997) Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* **65**: 1-8.
- Rousset, E., and Dubreuil, J.D. (1999) Evidence that *Escherichia coli* STb enterotoxin binds to lipidic components extracted from the pig jejunal mucosa. *Toxicon* **37**: 1529-1537.
- Ruiz-Bustos, E., Ochoa, J.L., Wadstrom, T., and Ascencio, F. (2001) Isolation and characterisation of putative adhesins from *Helicobacter pylori* with affinity for heparan sulphate proteoglycan. *J Med Microbiol* **50**: 215-222.
- Sanchez-SanMartin, C., Bustamante, V.H., Calva, E., and Puente, J.L. (2001) Transcriptional regulation of the *orf19* gene and the *tir-cesT-eae* operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**: 2823-2833.
- Sanger, J.M., Chang, R., Ashton, F., Kaper, J.B., and Sanger, J.W. (1996) Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton* **34**: 279-287.
- Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D.C., and Levine, M.M. (1991) Enteroregulative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J Clin Invest* **87**: 1450-1455.
- Savkovic, S.D., Koutsouris, A., and Hecht, G. (1996) Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect Immun* **64**: 4480-4487.
- Savkovic, S.D., Koutsouris, A., and Hecht, G. (1997) Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol* **273**: C1160-1167.
- Schauer, D.B., and Falkow, S. (1993) Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. *Infect Immun* **61**: 2486-2492.
- Sekiya, K., Ohishi, M., Ogino, T., Tamano, K., Sasakawa, C., and Abe, A. (2001) Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 11638-11643.
- Shaw, R.K., Daniell, S., Ebel, F., Frankel, G., and Knutton, S. (2001) EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* **3**: 213-222.
- Shin, S., Castanie-Cornet, M.P., Foster, J.W., Crawford, J.A., Brinkley, C., and Kaper, J.B. (2001) An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol* **41**: 1133-1150.
- Simonovic, I., Rosenberg, J., Koutsouris, A., and Hecht, G. (2000) EPEC dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions. *Cellul Microbiol* **2**: 305-315.
- Simonovic, I., Arpin, M., Koutsouris, A., Falk-Krzesinski, H.J., and Hecht, G. (2001) Enteropathogenic *Escherichia coli* Activates Ezrin, Which Participates in Disruption of Tight Junction Barrier Function. *Infect Immun* **69**: 5679-5688.
- Sinclair, J.F., and O'Brien, A.D. (2002) Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **277**: 2876-2885.

- Smith, D.K., Kassam, T., Singh, B., and Elliott, J.F. (1992) *Escherichia coli* has two homologous glutamate decarboxylase genes that map to distinct loci. *J Bacteriol* **174**: 5820-5826.
- Sorokina, E.A., and Kleinman, J.G. (1999) Cloning and preliminary characterization of a calcium-binding protein closely related to nucleolin on the apical surface of inner medullary collecting duct cells. *J Biol Chem* **274**: 27491-27496.
- Sperandio, V., Kaper, J.B., Bortolini, M.R., Neves, B.C., Keller, R., and Trabulsi, L.R. (1998) Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **164**: 133-139.
- Sperandio, V., Mellies, J.L., Nguyen, W., Shin, S., and Kaper, J.B. (1999) Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 15196-15201.
- Spitz, J., Yuhan, R., Koutsouris, A., Blatt, C., Alverdy, J., and Hecht, G. (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to intestinal epithelial monolayers diminishes barrier function. *Am J Physiol* **268**: G374-379.
- Staley, T.E., Jones, E.W., and Corley, L.D. (1969) Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *Am J Pathol* **56**: 371-392.
- Stein, M., Kenny, B., Stein, M.A., and Finlay, B.B. (1996a) Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**: 6546-6554.
- Stein, M.A., Mathers, D.A., Yan, H., Baimbridge, K.G., and Finlay, B.B. (1996b) Enteropathogenic *Escherichia coli* markedly decreases the resting membrane potential of Caco-2 and HeLa human epithelial cells. *Infect Immun* **64**: 4820-4825.
- Surette, M.G., and Bassler, B.L. (1998) Quorum sensing in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7046-7050.
- Surette, M.G., Miller, M.B., and Bassler, B.L. (1999) Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 1639-1644.
- Tacket, C.O., Sztein, M.B., Losonsky, G., Abe, A., Finlay, B.B., McNamara, B.P., Fantry, G.T., James, S.P., Nataro, J.P., Levine, M.M., and Donnenberg, M.S. (2000) Role of EspB in experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **68**: 3689-3695.
- Tamano, K., Aizawa, S., Katayama, E., Nonaka, T., Imajoh-Ohmi, S., Kuwae, A., Nagai, S., and Sasakawa, C. (2000) Supramolecular structure of the *Shigella* type III secretion machinery: the needle part is changeable in length and essential for delivery of effectors. *EMBO J* **19**: 3876-3887.
- Taylor, K.A., O'Connell, C.B., Luther, P.W., and Donnenberg, M.S. (1998) The EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. *Infect Immun* **66**: 5501-5507.
- Taylor, K.A., Luther, P.W., and Donnenberg, M.S. (1999) Expression of the EspB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun* **67**: 120-125.

- Tesh, V.L. (1998) Virulence of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: role of molecular crosstalk. *Trends Microbiol* **6**: 228-233.
- Thompson, J.F., and Landy, A. (1988) Empirical estimation of protein-induced DNA bending angles: applications to lambda site-specific recombination complexes. *Nucleic Acids Res* **16**: 9687-9705.
- Tobe, T., Schoolnik, G.K., Sohel, I., Bustamante, V.H., and Puente, J.L. (1996) Cloning and characterization of *bfpTVW*, genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**: 963-975.
- Tobe, T., Tatsuno, I., Katayama, E., Wu, C.Y., Schoolnik, G.K., and Sasakawa, C. (1999) A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol Microbiol* **33**: 741-752.
- Tzipori, S., Gibson, R., and Montanaro, J. (1989) Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. *Infect Immun* **57**: 1142-1150.
- Uchiya, K., Tobe, T., Komatsu, K., Suzuki, T., Watarai, M., Fukuda, I., Yoshikawa, M., and Sasakawa, C. (1995) Identification of a novel virulence gene, *virA*, on the large plasmid of *Shigella*, involved in invasion and intercellular spreading. *Mol Microbiol* **17**: 241-250.
- Vica Pacheco, S., Garcia Gonzalez, O., and Paniagua Contreras, G.L. (1997) The *lom* gene of bacteriophage lambda is involved in *Escherichia coli* K12 adhesion to human buccal epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett* **156**: 129-132.
- Wachter, C., Beinke, C., Mattes, M., and Schmidt, M.A. (1999) Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **31**: 1695-1707.
- Wainwright, L.A., and Kaper, J.B. (1998) EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**: 1247-1260.
- Wang, X.D., de Boer, P.A., and Rothfield, L.I. (1991) A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *EMBO J* **10**: 3363-3372.
- Warawa, J., Finlay, B.B., and Kenny, B. (1999) Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**: 5538-5540.
- Warawa, J., and Kenny, B. (2001) Phosphoserine modification of the EPEC Tir molecule is required to trigger conformational changes in Tir and efficient pedestal elongation. *Mol Microbiol* **42**: 1269-1280.
- Watson, J.D., Tooze, J., Kurtz, D.T., (1983) Recombinant DNA: A Short Course. W.H. Freeman, NewYork.
- Wattiau, P., Bernier, B., Deslee, P., Michiels, T., and Cornelis, G.R. (1994) Individual chaperones required for Yop secretion by *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 10493-10497.
- Wattiau, P., Woestyn, S., and Cornelis, G.R. (1996) Customized secretion chaperones in pathogenic bacteria. *Mol Microbiol* **20**: 255-262.
- Wieler, L.H., McDaniel, T.K., Whittam, T.S., and Kaper, J.B. (1997) Insertion site of the locus of enterocyte effacement in enteropathogenic and enterohemorrhagic

- Escherichia coli* differs in relation to the clonal phylogeny of the strains. *FEMS Microbiol Lett* **156**: 49-53.
- Wilson, R.K., Shaw, R.K., Daniell, S., Knutton, S., and Frankel, G. (2001) Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**: 753-762.
- Woestyn, S., Sory, M.P., Boland, A., Lequenne, O., and Cornelis, G.R. (1996) The cytosolic SycE and SycH chaperones of *Yersinia* protect the region of YopE and YopH involved in translocation across eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **20**: 1261-1271.
- Wolff, C., Nisan, I., Hanski, E., Frankel, G., and Rosenshine, I. (1998) Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**: 143-155.
- Yuhan, R., Koutsouris, A., Savkovic, S.D., and Hecht, G. (1997) Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **113**: 1873-1882.
- Zhou, G., Seibenhener, M.L., and Wooten, M.W. (1997) Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem* **272**: 31130-31137.
- Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M.S., Beaudry, M., and Fairbrother, J.M. (1994) Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**: 4153-4159.
- Zhu, C., Harel, J., Dumas, F., and Fairbrother, J.M. (1995a) Identification of EaeA protein in the outer membrane of attaching and effacing *Escherichia coli* O45 from pigs. *FEMS Microbiol Lett* **129**: 237-242.
- Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., and Fairbrother, J.M. (1995b) Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* **59**: 118-123.
- Zhu, C., Menard, S., Dubreuil, J.D., and Fairbrother, J.M. (1996) Detection and localization of the EaeA protein of attaching and effacing *Escherichia coli* O45 from pigs using a monoclonal antibody. *Microb Pathog* **21**: 205-213.
- Zobiack, N., Rescher, U., Laarmann, S., Michgehl, S., Schmidt, M.A., and Gerke, V. (2002) Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J Cell Sci* **115**: 91-98.