

Université de Montréal

**L'apolipoprotéine A-I interagit avec l'adhésine impliquée
dans l'adhérence diffuse (AIDA-I) d'*Escherichia coli* :
rôle lors du processus d'adhésion et d'invasion**

par

MÉLISSA RENÉ

Département de pathologie et de microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté de médecine vétérinaire
en vue de l'obtention du grade de maître ès sciences (M. Sc.)
en sciences vétérinaires
option microbiologie

Mai, 2010

© Mélissa René, 2010

Université de Montréal
Faculté de médecine vétérinaire

Ce mémoire intitulé

L'apolipoprotéine A-I interagit avec l'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I) d'*Escherichia coli* : rôle lors du processus d'adhésion et d'invasion

Présenté par :
MÉLISSA RENÉ

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

J. Daniel Dubreuil, président-rapporteur
Michaël Mourez, directeur de recherche
Éric Nadeau, co-directeur
Josée Harel, membre du jury

Résumé

L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I) est une adhésine bactérienne présente chez certaines souches d'*Escherichia coli* qui, associée aux toxines Stx2e ou STb, contribue à l'apparition de la maladie de l'œdème ou de la diarrhée post-sevrage chez les porcelets. AIDA-I est un autotransporteur qui confère des capacités d'autoaggrégation, de formation de biofilms et d'adhésion. L'objectif principal du projet de recherche consistait en la recherche de récepteur(s) potentiel(s) d'AIDA-I.

Les bactéries pathogènes adhèrent aux cellules-cibles soit en liant directement des molécules à la surface cellulaire ou en utilisant des molécules intermédiaires qui permettent de diminuer la distance séparant la bactérie de la cellule-cible. Puisque le sérum est un fluide qui contient de nombreuses molécules, celui-ci a été utilisé comme matériel de départ pour l'isolement de récepteur(s) potentiels. Nous avons isolé un récepteur potentiel à partir du sérum porcin : l'apolipoprotéine A-I. L'interaction entre l'apolipoprotéine A-I et AIDA-I a été confirmée par ELISA et microscopie à fluorescence.

La capacité à envahir les cellules épithéliales offre aux pathogènes la possibilité d'établir une niche intracellulaire qui les protègent contre les attaques du milieu extérieur. La présente étude a démontré que la présence d'AIDA-I en tant que seul facteur de virulence chez une souche de laboratoire permet de conférer la capacité d'envahir les cellules sans promouvoir la survie intracellulaire. L'étude de la souche sauvage 2787, exprimant AIDA-I en association avec d'autres facteurs de virulence, a démontré une différence significative pour les phénotypes d'invasion et de survie intracellulaire face à la souche de laboratoire exprimant AIDA-I.

Mots-clés : Autotransporteur, AIDA-I, *Escherichia coli*, Adhésine bactérienne, Adhésion, Invasion, Apolipoprotéine A-I, Microscopie à fluorescence, Survie intracellulaire.

Abstract

The adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) is a bacterial adhesin associated with some *Escherichia coli* strains that might, when associated with toxin Stx2e or STb, contribute to the development of edema disease or post-weaning diarrhea in piglets. AIDA-I is an autotransporter that mediates various phenotypes such as adhesion, autoaggregation and biofilm formation. The main aim of our project was to find potential receptor(s) for AIDA-I.

Pathogens can either bind cell directly by targeting exposed cell surface molecules or use an intermediate molecule as a bridge to lessen the space separating them from their target cell. Serum is known to contain a wide range of molecules so it has been used as raw material for the isolation of a putative receptor for AIDA-I. We isolated a putative receptor for AIDA-I: the apolipoprotein A-I. The interaction between the apolipoprotein A-I and AIDA-I was confirmed by ELISA and fluorescent microscopy.

The capacity to invade epithelial cell enables pathogens to create an intracellular niche that protects them against attacks from the extracellular environment. The present report has shown that the presence of AIDA-I as the sole virulence factor in a laboratory strain, enable bacteria to invade cultured cells but does not promote intracellular survival. Studies conducted on wild-type strain 2787, which express AIDA-I in association with other virulence factors, has shown a significant difference in invasion and intracellular survival phenotypes compared to the laboratory strain expressing AIDA-I.

Keywords : Autotransporter, AIDA-I, *Escherichia coli*, Bacterial adhesin, Adhesion, Invasion, Apolipoprotein A-I, Fluorescent microscopy, Intracellular survival.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX.....	vi
LISTE DES FIGURES.....	vii
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS.....	ix
DÉDICACE.....	xi
REMERCIEMENTS.....	xii
INTRODUCTION.....	1
RECENSION DE LITTÉRATURE.....	4
1.0 La maladie de l'œdème et la diarrhée post-sevrage	5
1.1 La maladie de l'œdème (MO).....	5
1.2 La diarrhée post-sevrage	6
2.0 Les pathotypes d'<i>Escherichia coli</i>	6
3.0 Les adhésines chez <i>E. coli</i>.....	12
3.1 Les adhésines fimbriales.....	13
3.1.1 <i>Le système de chaperonne-placier.....</i>	<i>14</i>
3.1.2 <i>Le pili de type IV.....</i>	<i>16</i>
3.1.3 <i>La voie de nucléation/précipitation</i>	<i>17</i>
3.2 Adhésines afimbriales.....	18
3.2.1 <i>Les adhésines membranaires.....</i>	<i>18</i>
3.2.2 <i>Adhésines reliées au système de sécrétion de type 3</i>	<i>19</i>
3.2.3 <i>Les flagelles.....</i>	<i>20</i>
3.2.4 <i>Le système de sécrétion de type V.....</i>	<i>20</i>
3.2.5 <i>Les autotransporteurs et l'adhésion</i>	<i>21</i>
3.3 Les adhésines non protéiques	25
3.3.1 <i>Les lipopolysaccharides</i>	<i>25</i>
4.0 Les invasines d'<i>E. coli</i>.....	25

4.1 L'invasion par endocytose induite	26
4.1.1 <i>Invasion engendrée par le système de sécrétion de type 3.....</i>	26
4.2 L'invasion active.....	27
4.2.1 <i>Les autotransporteurs et l'invasion</i>	28
5.0 Récepteurs engagés par les adhésines/invasines bactériennes	29
5.1 Composés d'adhérence des cellules eucaryotes	29
5.1.1 <i>Composés de la matrice extracellulaire.....</i>	29
5.1.2 <i>Les sucres et les molécules glycosylées</i>	31
5.2 Autres récepteurs engagés par les adhésines/invasines	33
5.2.1 <i>Les radeaux lipidiques</i>	33
5.2.2 <i>Les lectines</i>	33
5.2.3 <i>Les contre-récepteurs des intégrines</i>	34
5.2.4 <i>Les molécules sériques : les apolipoprotéines</i>	34
6.0 L'autotransporteur AIDA-I.....	36
6.1 Prévalence d'AIDA-I dans les souches d'<i>E. coli</i> pathogènes.....	38
7.0 Étude sur l'autotransporteur AIDA-I	39
7.1 Étude sur le récepteur d'AIDA-I	39
7.2 Étude de l'invasion <i>in vitro</i> conférée par AIDA-I.....	40
MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS.....	42
ARTICLE 1 : The apolipoprotein A-I interacts with the adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) of Escherichia coli : involvement in the adhesion and invasion process.....	43
DISCUSSION	72

CONCLUSION.....	82
BIBLIOGRAPHIE	85
ANNEXE 1	99

LISTE DES TABLEAUX**REVUE DE LITTÉRATURE**

Tableau I. Les adhésines autotransporteurs.....	24
Tableau II. Exemple d'études montrant la prévalence d'AIDA-I chez les souches porcines isolées de diarrhée.....	39

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LITTÉRATURE

Figure 1. Mode d'adhésion des différents pathotypes d' <i>E.coli</i> causant la diarrhée.	11
Figure 2. Adhésion bactérienne à la cellule-hôte.....	12
Figure 3. Schématisation de divers types d'adhésines.....	13
Figure 4. Représentation schématique du système de sécrétion de type V.....	23
Figure 5. Routes d'invasion utilisées par les bactéries pour envahir une cellule-hôte..	26
Figure 6. Représentation schématique de la translocalisation et de la présentation de l'AT AIDA-I.....	37

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

ARTICLE 1

Figure 1. Interaction between purified AIDA-I and extracellular matrix proteins.	60
Figure 2. Interaction between AIDA-I and porcine serum.....	61
Figure 3. Bands obtained by serum fractionation by means of ion exchange chromatography followed by gel filtration.....	62
Figure 4. Interaction between purified apolipoprotein A-I and AIDA-I.....	63

Figure 5. Interaction between apolipoprotein A-I and solution of purified AIDA-I free of LPS..... 64

Figure 6. Interaction between purified apolipoproteins and AIDA-I..... 65

Figure 7. Colocalization of bacteria expressing AIDA-I and the apolipoprotein A-I on cultured epithelial cell..... 66

ANNEXE 1

Figure 1. Cinétique d'invasion et survie intracellulaire des *E. coli* exprimant AIDA-I..... 76

Figure 2. Cinétique d'invasion et survie intracellulaire des *E. coli* 2787..... 77

LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AAF	Aggregative Adhesion Fimbriae
Aah	Adhesin Aida heptosyltransférase
ADN	Acide désoxyribonucléique
Afa	Afimbrial Adhesins
AIDA	Adhesin Involved in Diffuse Adherence
AIEC	Adherent Invasive <i>E. coli</i>
Ag43	Antigen 43
APEC	Avian Pathogenic <i>E. coli</i>
Apo A-I	Apolipoprotéine A-I
ARN	Acide ribonucléique
AT	Autotransporteur
BFP	Bundle-forming Pili
Cah	Calcium-binding Ag43 homologue
CEACAM	Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecules
CF	Colonization Factor
Csg	Curli synthesis gene
DAEC	Diffusely Adhering <i>E. coli</i>
DAF	Decay Accelerating Factor
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DPBS	Dulbecco's Phosphate Buffered Saline
DPS	Diarrhée Post-Sevrage
EAEC	Enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAST1	Enteroaggregative <i>E. coli</i> Heat-Stable Toxin 1
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EHEC	Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
EPEC	Enteropathogenic <i>E. coli</i>
Esp	<i>E. coli</i> Secreted Proteins
ETEC	Enterotoxigenic <i>E. coli</i>
ExPEC	Extra-intestinal Pathogenic <i>E. coli</i>
GFP	Green-Fluorescent Protein
Hap	<i>Haemophilus</i> Adhesin and Penetration protein
HDL	High-density Lipoprotein
Hia	<i>Haemophilus influenzae</i> adhesin
HisG	Six Histidine and Glycine Tag
HlyA	Haemolysin A
HRP	Horseradish-Peroxidase
ICAM	Inter-Cellular Adhesion Molecule

Iha	IrgA homologue adhesin
IPTG	Isopropyl- β -d- Thiogalactopyranoside
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LDL	Low-Density Lipoprotein
LEE	Locus of Enterocyte Effacement
LP	Long Polar
LT	Heat-Labile Toxin
LPV	Lipo-Viro-Particles
MBP	Maltose-Binding Protein
MO	Maladie de l'œdème
NS	Nonstructural
Omp	Outer membrane protein
PBS	Phosphate-buffered-saline
PBS-CM	PBS + 0.0001 M CaCl ₂ + 0.001 M MgCl ₂
RT-PCR	Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction
S	Test standard
Saa	STEC autoagglutinating adhesin
SAAT	Self-Associating Autotransporter
SDS-PAGE	Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis
SOF	Serum Opacity Factor
SPR	Surface Plasmon Resonance
ST	Heat-stable Toxin
STEC	Shiga-toxin <i>E. coli</i>
Stx	Shiga-toxin like
Tia	Toxigenic Invasion Loci A
Tib	Toxigenic Invasion Loci B
Tir	Translocated Intimin Receptor
TMB	3,3',5,5' -tetramethylbenzidine
UPEC	Uropathogenic <i>E. coli</i>
VacA	Vascular Cell Adhesion Molecule
VCAM	Vacuolating Cytotoxin
VLDL	Very-Low Density Lipoprotein
Yad	<i>Yersinia enterocolitica</i> Adhesin

*À mes parents, qui m'ont toujours
épaillée tout au long du chemin que je
désirais parcourir dans le domaine du
savoir!*

Remerciements

Mon tout premier remerciement est dédié à mon directeur de recherche, le Dr Michaël Mourez. Je n'aurais pu accomplir ces travaux sans son influence positive, son soutien, sa patience et, il ne faut pas le passer sous le silence, ses nombreux efforts pour transmettre à ses étudiants sa passion pour le domaine de la science. Grâce aux nombreux dialogues entamés en réunion, à son bureau ou même encore dans le couloir entre deux réfrigérateurs, j'ai pu développer une vision globale du domaine de la science tout en ne perdant pas de vue les découvertes et les événements possédant des liens plus étroits avec mon domaine d'étude. Je lui suis grée d'avoir su me guider intelligemment tout au long de mon parcours et d'avoir également démontré à de nombreuses occasions l'étendue de ses qualités professionnelles et humaines. J'aimerais également le remercier chaleureusement de m'avoir soutenue lors mes nombreuses démarches particulières pour me permettre d'explorer un peu plus le monde. J'espère sincèrement pouvoir rendre honneur à la qualité de son enseignement en transmettant une partie de sa passion et de son savoir à mes futurs étudiants.

Je remercie vivement mes collaborateurs, notamment le Dr François Lépine et le Dr Mark Hancock pour leur participation active à ce projet. Ils ont contribué à la réussite de ce projet et je les en remercie.

Je remercie mon co-directeur, Éric Nadeau, pour les conseils et les encouragements proférés lors de mes comités conseils. J'aimerais également remercier les membres de mon comité conseil, Josée Harel et Carl A. Gagnon, pour leur écoute attentive et leurs judicieux conseils.

Merci à mon président de jury, J. Daniel Dubreuil, d'avoir accepté de juger mon travail. Merci également à Josée Harel de faire partie de mon jury.

Merci également à tous les étudiants du laboratoire, présent et passé, dont particulièrement Victoria Girard et Marie-Ève Charbonneau pour leur aide technique ainsi que pour les discussions intéressantes.

Merci également à l'assistant de laboratoire Frédéric Berthiaume pour sa disponibilité, sa patience et sa bonne humeur légendaire ainsi que pour son aide et ses ressources de savoir technique.

J'aimerais remercier mes amis et amies, particulièrement Dave Boucher, Isabelle Martel, Isabelle Ménard et Karen St-Pierre, pour leur amitié, leur support. Ils m'ont souvent écouté, conseillée, encouragée et ont également su partager mes hauts et mes bas. Votre présence à mes côtés m'a été très précieuse.

J'aimerais vivement remercier mes parents qui m'ont appuyé sans compter tout au long de mes études. J'aimerais également remercier ma famille pour leurs encouragements et leur soutien. La réussite de mon parcours scolaire leur revient en grande partie, merci mille et une fois!

INTRODUCTION

L'adhésion est une étape essentielle dans l'établissement du processus infectieux. Il est reconnu qu'une bactérie, pour s'établir dans l'organisme, doit d'abord adhérer aux cellules de l'hôte ou à la matrice extracellulaire, afin de pouvoir résister aux différents mécanismes susceptibles de l'éliminer, comme le flux urinaire ou le péristaltisme intestinal. Cette adhésion peut être engagée directement c'est-à-dire via l'interaction de molécules présentes à la surface de la cellule, ou indirectement, c'est-à-dire via l'attachement de l'adhésine à un facteur soluble servant de «pont» entre la bactérie et la cellule de l'hôte. La grande diversité des molécules se retrouvant à la surface des cellules ainsi que dans les fluides entourant ces dernières constituent des cibles de choix pouvant être utilisées comme récepteur direct ou indirect par les pathogènes lors de l'adhésion. La grande diversité des adhésines présentes chez les différents pathotypes de la bactérie *Escherichia coli* démontre que ce groupe possède la capacité d'utiliser un nombre important de molécules diverses et variées à la surface cellulaire afin de promouvoir son adhésion aux cellules épithéliales. Les récepteurs reconnus par les adhésines autotransporteurs ne font pas exception. Les adhésines autotransporteurs sont une catégorie d'adhésine formée d'un regroupement de protéines multifonctionnelles possédant une organisation structurale distincte : séquence signal en N-terminal suivit d'un domaine passager, d'un domaine de jonction et d'une unité de translocalisation en C-terminal. Les récepteurs cellulaires de diverses adhésines autotransporteurs ont été identifiés cependant, le récepteur cellulaire de l'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I) n'est pas connu. L'objectif principal de ce mémoire est la recherche du récepteur de l'autotransporteur AIDA-I.

L'environnement extracellulaire intestinal est un milieu hostile à l'égard des bactéries. Ce milieu présente diverses caractéristiques mécaniques, chimiques et immunitaires représentant une menace pour les bactéries. De nombreuses espèces bactériennes ont développé diverses stratégies d'invasion afin de pénétrer à l'intérieur des cellules, là où elles sont partiellement protégées contre les agressions du milieu extérieur. Il a été démontré que plusieurs autotransporteurs confèrent un phénotype d'invasion de la cellule-hôte aux bactéries qui les expriment. Le second objectif de ce

mémoire est d'étudier la capacité de l'autotransporteur AIDA-I à entraîner l'invasion des cellules-hôte et à permettre la survie subséquente des bactéries intracellulaire.

RECENSION DE LITTÉRATURE

1.0 La maladie de l'œdème et la diarrhée post-sevrage

Les propriétaires des cheptels de l'industrie porcine doivent faire face aux répercussions engendrées par les pathologies d'origine bactérienne qui affectent les porcelets. Deux de ces pathologies, la maladie de l'œdème (MO) et la diarrhée post-sevrage (DPS), affectent les porcelets lors d'une étape primordiale de leur croissance : le sevrage. Cette étape du développement de l'animal est cruciale puisqu'elle occasionne un stress alimentaire et comportemental important. Les porcelets soumis à ces stress deviennent plus vulnérables aux bactéries pathogènes présentes dans leur environnement. (110) En effet, la privation de lait maternel occasionne de nombreux désavantages pour le porcelet puisque le lait contient de multiples molécules bénéfiques transférées verticalement de la mère à sa progéniture. (107) Les anticorps contenus dans le lait maternel permettent l'inhibition de la croissance des bactéries, dont *Escherichia coli*, lors de l'allaitement. De plus, ces anticorps permettent l'inhibition de l'adhésion des bactéries telle que *E. coli* aux entérocytes et favorise leur phagocytose. Le lait de truie renferme également des transferrines et des lactoferrines, deux protéines reconnues pour leur action inhibitrice sur la croissance bactérienne. Bien entendu, tous ces effets protecteurs sont perdus lors du sevrage des porcelets ce qui peut entraîner le développement de pathogénies telle que la MO et la DPS. (177)

1.1 La maladie de l'œdème

La MO est une affection qui se déclare généralement lors des deux premières semaines suivant le sevrage du porcelet. Elle est principalement causée par des *Escherichia coli* qui expriment la toxine Stx2e (73, 112, 172). Lors de l'étape préliminaire à la pathogénèse, l'agent infectieux adhère et colonise le petit intestin. L'adhésion et la colonisation est généralement effectuée via le fimbriae F18 mais diverses études ont également démontré la présence de d'autres adhésines telles que l'autotransporteur (AT) AIDA-I (36, 65, 66, 68, 118, 160, 179, 187). Une fois adhérente aux cellules, la bactérie sécrète la toxine Stx2e dans le lumen de l'intestin. Le transfert subséquent de la toxine dans le sang permettra sa dissémination à travers

tout l'organisme entraînant le développement de la MO. Les sujets atteints de la MO présentent de nombreux symptômes pathologiques tels que la perte d'appétit, l'œdème, l'ataxia et leur état peut également dégénérer jusqu'à entraîner la mort de l'animal. L'analyse *post-mortem* des animaux atteints de MO démontre la présence de lésions intestinales, d'œdème de l'estomac, des paupières et du méso côlon ainsi qu'un estomac plein (73, 107, 177).

1.2 La diarrhée post-sevrage

La DPS se déclare également aussi lors des 2 premières semaines suivant le sevrage du porcelet. Elle est principalement causée par la prolifération et la colonisation d'*Escherichia coli* dans le jéjunum et l'iléum des porcelets. L'adhésion aux parois intestinales est effectuée par diverses adhésines (ex. F4, F18, AIDA-I). Les *Escherichia coli* engendrant la DPS expriment et sécrètent une ou plusieurs des entérotoxines suivantes : STa, STb, LT et/ou EAST1 (36, 56, 65, 66, 68, 118, 160, 179). La sécrétion des toxines dans le petit intestin entraîne un déséquilibre de l'eau et des électrolytes qui se traduit par le développement d'une diarrhée aqueuse de couleur jaune chez le porcelet. L'observation de l'animal permet couramment de dénoter un bleuissement des oreilles et de l'abdomen. La DPS entraîne une perte de poids importante chez l'animal et peut se solder par la mort de celui-ci. L'analyse *post-mortem* des animaux atteints de DPS démontre fréquemment une déshydratation importante, un petit intestin dilaté présentant de l'œdème (177).

2.0 Les pathotypes d'*Escherichia coli*

Escherichia coli est une entérobactérie Gram négatif retrouvée dans le tractus gastro-intestinal de nombreux animaux à sang chaud, dont l'homme, où elle joue communément le rôle de bactérie commensale. Cependant, l'acquisition et la combinaison de facteurs de virulence chez une bactérie peut entraîner des modifications de son comportement pouvant occasionner le développement de

diverses infections telles que des méningites, des septicémies, des infections gastro-intestinales ou urinaires. Les facteurs de virulence peuvent être des éléments structuraux, tels les flagelles et les adhésines; des éléments physiologiques telles la production de toxines ou la synthèse d'enzymes permettant l'infection de l'hôte. Traditionnellement, les *E. coli* pathogènes sont divisées en 7 groupes majeurs (113, 137, 154, 183) selon le type de pathogénie engendrée et les facteurs de virulence possédés: ETEC (*E. coli* Entérotoxinogènes), EHEC (*E. coli* Entérohémorragiques), EPEC (*E. coli* Entéropathogènes), DAEC (*E. coli* médiant l'Adhérence Diffuse), EAEC (*E. coli* Entéroagréatives), EIEC (*E. coli* Entéroinvasives) et les ExPEC (*E. coli* responsables d'infections Extra-intestinales) (Figure 1). Cependant, il est important de noter que différentes classifications coexistent. Diverses revues font état de l'existence de groupes distincts; nous pourrions citer entre-autres le groupe des APEC (Avian Pathogenic *E. coli*) rassemblant les *E. coli* qui engendrent des pathologies chez le poulet (41, 88) ainsi que le groupe des AIEC (Adherent Invasive *E. coli*) qui est associé avec la maladie de Crohn (33, 106).

- Chez le porc, certains sérogroupes d'ETEC, dont majoritairement O8, O138, O139, O141, O149 et O157, sont associés à la DPS. Ces ETEC sont également responsables de l'apparition de diarrhées néonatales et post-sevrage chez les porcelets. L'infection chez le porc est effectuée via la colonisation du petit intestin grâce à la présence d'adhésines fimbriales péritriches telles que F4, F5, F18 et F41. Les ETEC arborent deux classes de toxines qui peuvent être retrouvées seules ou en combinaison : les toxines ST (Heat-stable enterotoxin) et LT (Heat-labile enterotoxin) (35, 74, 80, 147).

- Les EPEC engendrent des diarrhées chroniques ou mucoïdes chez les porcs infectés. Les EPEC adhèrent intimement à la membrane des cellules épithéliales intestinales où elles forment des microcolonies. L'adhésion est caractérisée par l'accumulation d'actine polarisée sous la bactérie, l'élaboration d'un piédestal et la formation de lésions de type attachant et effaçant chez les sujets atteints. L'adhésion intime avec la cellule épithéliale est effectuée via l'intimine et/ou le pili de type IV aussi désigné sous le nom de Bfp (Buddle forming pili). La présence du locus d'effacement des

entérocytes (LEE; Locus of Enterocyte Effacement) permet la formation du système de sécrétion de type 3 qui sécrète des effecteurs nommés Esp (*E. coli* Secreted Protein) dans la cellule épithéliale. L'action combinée engendrée par les facteurs de virulence des EPEC provoque l'effacement des microvillis de l'intestin ce qui peut entraîner de graves conséquences pour le sujet atteint puisque ce phénomène peut diminuer la capacité d'absorption des nutriments chez l'hôte atteint (80, 148, 167).

-Les EHEC provoquent une diarrhée sanguinolente accompagnée d'œdème chez les sujets atteints. Le LEE présent chez les EHEC permet l'expression d'effecteurs associés au système de sécrétion de type 3 permettant l'adhésion et la formation de lésions attachantes et effaçantes qui sont, pour ce pathotype, confinées au gros intestin. Les EHEC possèdent de nombreuses adhésines afimbriales et fimbriales telles que le fimbriae LP (Long Polar), les adhésines Iha (IrgA Homolog Adhesin), Efa (EHEC Factor for Adherence) ainsi que de nombreuses toxines dont majoritairement Stx, EAST1 et l'hémolysine. (148, 161)

-Les EAEC sont associées aux infections se traduisant par une diarrhée aiguë et persistante accompagnée d'une augmentation de la sécrétion du mucus intestinal. L'adhésion s'effectue dans le petit et le gros intestin via les fimbriae AAFs (Aggregative adherence fimbriae) et est caractérisée par des masses importantes de bactéries agrégées à la surface cellulaire (stacked-brick pattern). La production massive de mucus stimulée par ce type d'adhérence permet aux EAEC de s'enfermer à l'intérieur de biofilms protecteurs. Les toxines telles que Pet, EAST1, ShET1 sont retrouvées chez ce pathotype *d'E. coli* sont présentes en association variée dans les différentes souches (94, 148).

-Les EIEC sont associées aux cas de diarrhée aqueuse, de dysenterie bacillaire et d'ulcération mucoale. L'adhésion et l'invasion sont effectuées via les effecteurs du système de sécrétion de type 3 codées par le LEE et par les invasines Ipa (Invasin Plasmid Antigen). Il est généralement accepté que les shigelles font partie intégrante du groupe des EIEC puisque la différence génomique entre les deux espèces est

faible, par exemple elle n'est évaluée qu'à environ 1.5%. entre *E. coli* K-12 et *Shigella flexneri*. De plus, les EIEC et les shigelles utilisent le même mécanisme d'invasion. Il est donc commun d'inclure les shigelles dans le groupe des EIEC. L'invasion des cellules épithéliales du gros intestin par les EIEC est effectuée via un mécanisme particulier qui implique la pénétration initiale des cellules M ainsi que la phagocytose par les macrophages. Subséquemment, les EIEC lysent les vacuoles endocytiques et induisent l'apoptose des macrophages ce qui leur permet d'échapper à la destruction par la cellule de l'hôte. Une fois libérées, les bactéries se multiplient et pénètrent les entérocytes via le côté basolatéral de la cellule. Une vacuole sera alors formée autour de la bactérie et sera par la suite détruite afin que les bactéries puissent se retrouver dans le cytoplasme de la cellule. Les EIEC envahissent ensuite les cellules adjacentes grâce au mouvement engendré par les projections d'actine polarisée. Ce mécanisme d'invasion des cellules adjacentes sans quitter le cytoplasme de la cellule hôte constitue un avantage important pour la bactérie car celle-ci évite l'exposition au milieu extracellulaire et de ce fait, aux mécanismes immunitaires de l'hôte (148).

-Les ExPEC sont classées dans un groupe très différent des autres *E. coli* pathogènes puisqu'elles causent des infections extra-intestinales chez les sujets atteints. Ce groupe comprend les *E. coli* créant des méningites ainsi que les *E. coli* uropathogènes (UPEC) créant des infections urinaires. Les diverses ExPEC possèdent de nombreuses adhésines comprenant des AT trimériques, des curli, des adhésines fimbriales et afimbriales. Les diverses souches d'UPEC sont caractérisées par la présence de fimbriae importants, le fimbriae de type 1 et le pili P, ainsi que par plusieurs toxines dont entre-autres Vat (Vacuolating autotransporter toxin) et HlyA (Haemolysin A) (83, 94, 121, 148).

-Les DAEC sont impliquées dans des cas de diarrhée chez les porcs. Ce pathotype est caractérisé par un patron d'adhérence diffuse à la surface des cellules épithéliales. Ce pathotype possède de nombreuses adhésines dont plusieurs adhésines de la famille Afa/Dr (Afimbrial Adhesin) telles que les adhésines Afa, des adhésines fimbriales

dont F1845 ainsi que des AT tels que AIDA-I (94, 148). Cette dernière est l'objet d'étude du présent mémoire.

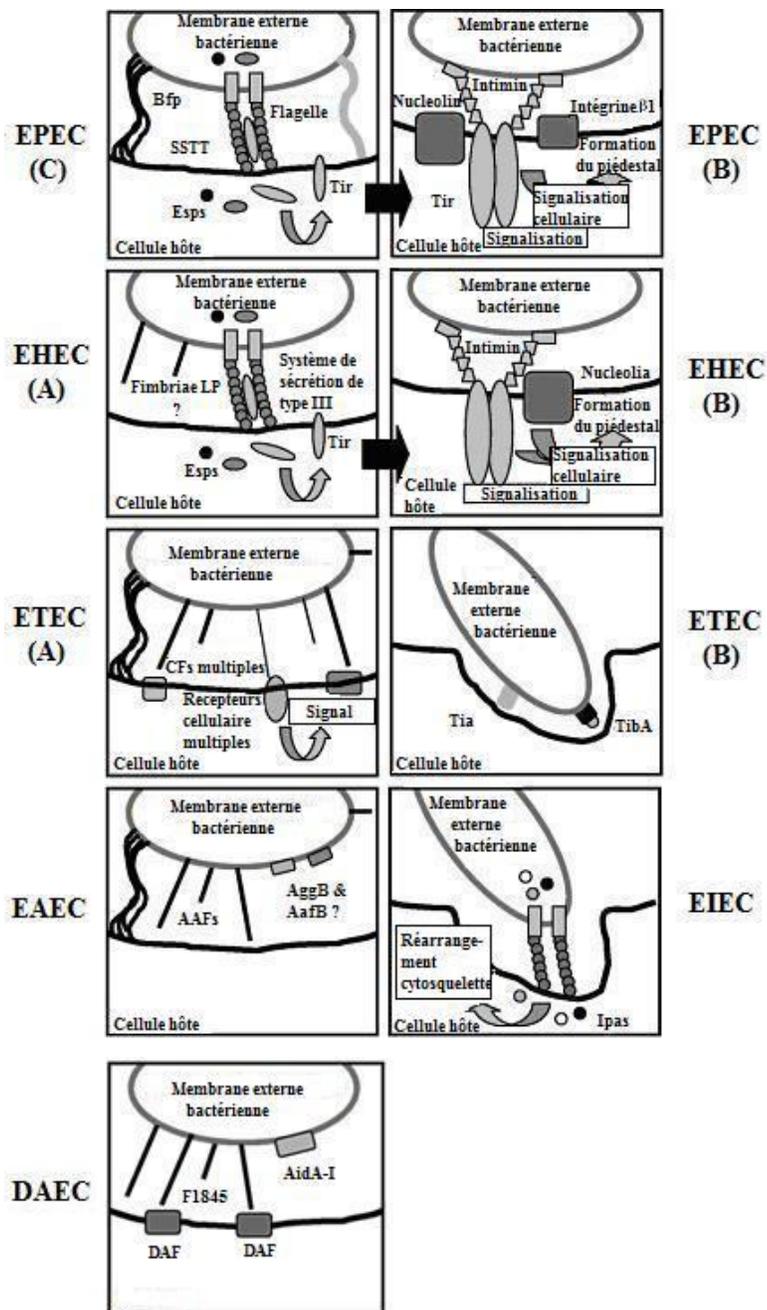


Figure 1 : Mode d'adhésion des différents pathotypes d'E.coli causant la diarrhée. Les six pathotypes représentés ici sont tous capables d'adhérer aux cellules de l'hôte par l'intermédiaire d'adhésines propres à chaque pathotype. Dans le cas des EPEC, des ETEC et des EHEC, l'adhésion initiale (A) et l'adhésion ultérieure (B) sont figurées. Adapté de la Nataro et Kaper, 1998 (113).

3.0 Les adhésines chez *E. coli*

L'adhésion d'*E. coli* aux tissus de l'hôte est une étape primordiale lors du développement de la pathogenèse. En adhérant aux tissus de l'hôte, les bactéries acquièrent une résistance vis-à-vis les forces mécaniques qui tendent à promouvoir leur élimination. L'attachement aux tissus de l'hôte peut être effectué directement, c'est-à-dire via l'interaction de l'adhésine avec des molécules de la surface de la cellule, ou indirectement, c'est-à-dire via l'attachement de l'adhésine à un facteur soluble servant de «pont» entre la bactérie et la cellule de l'hôte (Figure 2) (52, 96). Les différents pathotypes d'*E. coli* ont cumulé un nombre prodigieux d'adhésines diverses et tenter de les citer en entier serait laborieux. Le lecteur est invité à se référer aux nombreuses revues traitant de ce sujet pour une liste complète (94, 147, 158, 161, 167, 170). Les principales adhésines d'*E. coli* peuvent être divisées en trois groupes : les adhésines fimbriales, afimbriales et autres types d'adhésines (Figure 3).

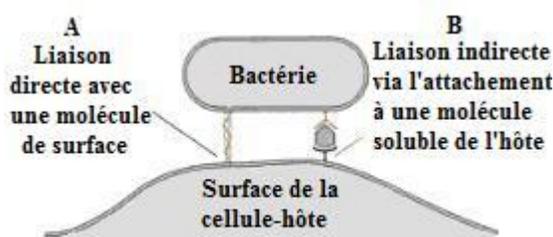


Figure 2. Adhésion bactérienne à la cellule-hôte. La bactérie utilise un récepteur présent à la surface de la cellule (A) ou utilise l'interaction d'une molécule de l'hôte avec son récepteur cellulaire pour former un pont entre la bactérie et la cellule-hôte (B). Adapté de Finlay and Caparon, 2005 (52).

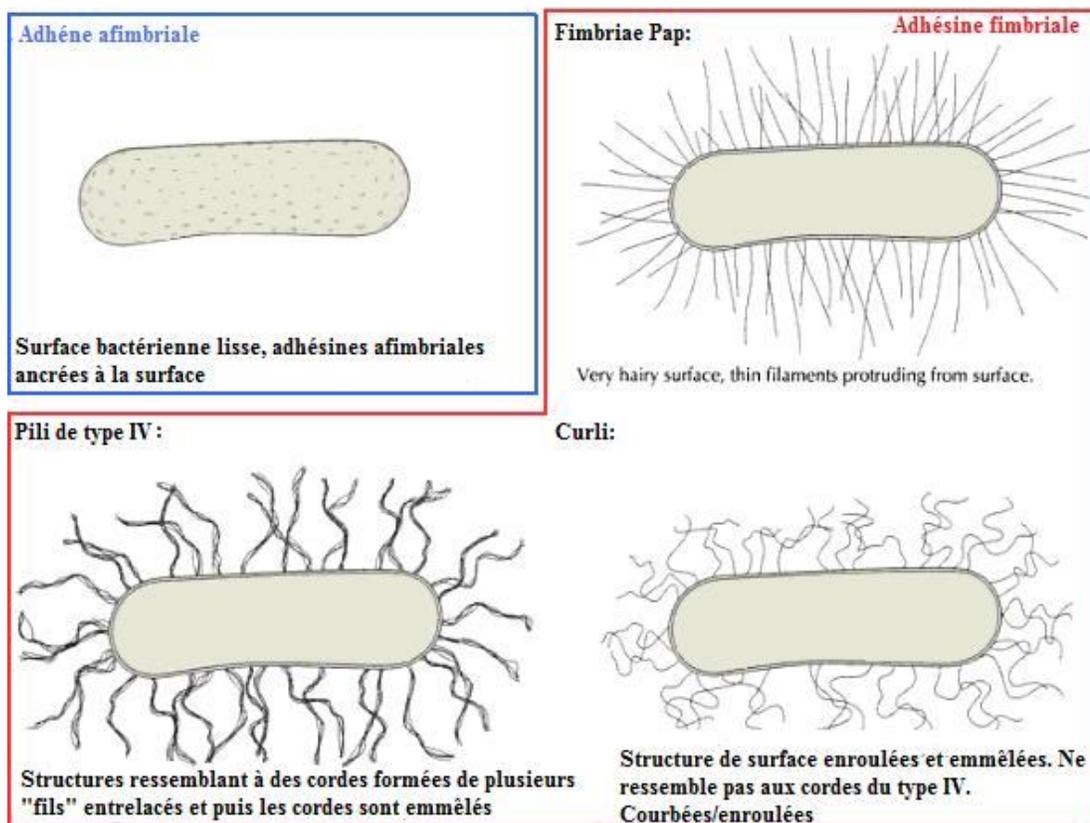


Figure 3. Schématisation de divers types d'adhésines. Adapté de Finlay and Caparon, 2005 (52).

3.1 Les adhésines fimbriales

Les adhésines fimbriales sont des protéines formant des appendices rigides, droits et filamenteux ancrés dans la membrane bactérienne qui permettent l'adhésion bactérienne aux tissus de l'hôte. Elles sont constituées de centaines, voir de milliers de sous-unités et se distinguent des flagelles par leur absence de motilité et par leur diamètre exigü (2 à 8 nm contrairement à 20 nm pour les flagelles). Ce groupe comprends de nombreuses adhésines dont les plus connues sont le pili de type I, le pili P, les adhésines Afa/Dr (fimbrial adhesin family), les adhésines AAF, le pili de type IV, les fimbriae F4, F18 et les curli. Ces diverses adhésines peuvent être regroupées selon leur mode d'assemblage et de sécrétion soit le système de chaperonne-placier, le système homologue au système de sécrétion de type 2 et la voie de nucléation/précipitation (44, 101, 148, 167).

3.1.1 Le système de chaperonne-placier

Le système de chaperonne-placier est couramment utilisé lors de l'assemblage des pili à la surface bactérienne. La synthèse des adhésines sécrétées par ce système peut être divisée en quatre étapes : le passage de la membrane interne, la prise en charge par la chaperonne, le transfert au placier et finalement la sécrétion à la surface bactérienne. La première étape, qui consiste en la traversée de la membrane interne des sous-unités du pilus, est effectuée via la machinerie de sécrétion sec. Les sous-unités sont ainsi retrouvées dans le périplasma d'où elles sont prises en charge par la chaperonne périplasmique. La chaperonne assure divers rôles primordiaux : 1) empêcher la polymérisation des sous-unités du pilus puisque dans le cas contraire, celles-ci seront dégradées par la protéase DegP 2) favoriser le repliement conforme des sous-unités et 3) diriger les sous-unités vers le placier. Le placier est une protéine de la membrane externe servant de plateforme d'assemblage pour la formation du pilus grâce à sa capacité à recruter les chaperonnes périplasmiques dans un ordre très précis. Suite au recrutement et à l'assemblage des sous-unités, le placier sécrète le pilus à la surface bactérienne (18).

Plusieurs adhésines fimbriales sont assemblées et sécrétées par le système de chaperonne-placier. Les plus connues et communes sont le pilus de type I, le pilus P (pyelonephritis-associated P pilus), les fimbriae F4, F18, la famille des adhésines Afa/Dr ainsi que les fimbriae AAF. Le pilus de type I est très répandu et peut être retrouvé chez les souches commensales d'*E. coli* ainsi que dans plus de 90% des UPEC tandis que le pilus P est retrouvé chez plus de 80% des UPEC engendrant des pyélonéphrites et également chez certains autres types d'ExPEC. Les pili de types I et P sont respectivement codés par les regroupements de gènes *fim* et *pap* possédant une organisation génétique semblable. Ces deux pili sont soumis à une régulation de phase, c'est à dire que la bactérie varie entre des cycles où sa surface est exempte de pilus (aussi appelé phase «off») et des cycles où le pilus y est présent (aussi appelé phase «on»). Cependant, il est à noter qu'une divergence au niveau du mécanisme utilisé pour la régulation de phase de ces deux pili existe. En effet, l'alternance entre les phases «on» et «off» chez le pilus de type I est effectuée grâce à la recombinase

FimB et la protéine FimE dont l'action combinée provoque l'inversion d'un segment d'ADN en aval de la sous-unité majeure ce qui permet ou non la transcription des gènes du pilus de type I. Chez le pilus P, la régulation de phase est contrôlée grâce à une méthylation différentielle de l'ADN effectuée par les protéines PapI et PapB. Puisque ces deux pili possèdent une biogénèse similaire, nous pouvons utiliser l'exemple du pilus de type I afin d'illustrer le principe de l'assemblage des pili par le système de chaperonne-placier. La biogénèse du pilus de type I est assurée par la chaperonne périplasmique FimC qui lie et guide les sous-unités du pilus vers le placier FimD qui assemble et sécrète le pilus. Le pilus de type I est formé de nombreuses répétitions (500-3000) de la sous-unité structurale majeure FimA assemblées en une hélice droite dont les sous-unités sont liées entre-elles par des liens non covalents. Au bout de l'hélice est annexé le fimbrillum, structure composée de plusieurs sous-unités de FimF et FimG. À l'extrémité du fimbrillum est adjointe la sous-unité FimH responsable de la capacité d'adhésion au pilus de type I (29, 60, 83, 85, 117). Il a été observé que l'adhésine FimH présente une hétérogénéité significative au niveau de sa séquence pouvant engendrer une modification de l'affinité de FimH pour les motifs d'oligomannose qui peut se traduire par une altération du pouvoir pathogène de la bactérie. Pour de plus amples détails, se référer à la section 5.1.2 page 31.

Le système de chaperonne-placier permet également l'assemblage de d'autres adhésines dont les fimbriae AAF et les adhésines de la famille Afa/Dr. Les fimbriae AAF sont retrouvés chez les pathotypes EAEC et les gènes nécessaires à la formation des ces fimbriae sont situés à l'intérieur de plasmides transmissibles de 60-65 MDa nommés pAA. Ces plasmides présentent des caractéristiques variées tant au niveau du gène codant pour l'adhésine que de la toxine, ce qui ne les empêche pas d'avoir des loci génétiques conservés et d'appartenir à une même famille. L'absence de ressemblance significative au niveau de la séquence d'ADN des adhésines AAF avec d'autres adhésines connues fait des adhésines AAF une famille unique. Les gènes codant pour ces adhésines sont retrouvés sous deux groupes de gènes distincts. Le premier groupe comprend les gènes codant pour la chaperonne (*aafD*), l'adhésine

(*aafA*) et l'activateur de transcription (*aggR*). Le deuxième groupe comprend les gènes de la chaperonne silencieuse (*AafD'*), du placier (*AafC*) ainsi qu'un gène relié à l'invasine AfaD (*AafB*). Cette organisation génique particulière et conservée est caractéristique des adhésines AAF des EAEC (94, 132). La seconde famille à être assemblée et sécrétée par le système de chaperonne-placier est la famille Afa/Dr. Cependant, il est à noter que quelques adhésines afimbriales de cette famille ne sont pas sécrétées par le système de chaperonne-placier. La famille d'adhésine Afa/Dr constitue un groupe peu homogène d'adhésines dont les membres sont sélectionnés en fonction de leur capacité à reconnaître l'antigène Dr du DAF (decay-accelerating factor aussi appelé CD55) situé à la surface des cellules épithéliales intestinales ou urinaires. La biogenèse des adhésines Afa/Dr nécessite l'action conjointe de la chaperonne périplasmique AfaB, du placier AfaC ainsi que des deux régulateurs de transcription AfaA et AfaF. Chez les *E. coli*, la présence des adhésines Afa est associée à la capacité de créer des infections urinaires et des diarrhées tandis que la présence des adhésines Dr est associée à la capacité à créer uniquement des infections urinaires (95, 132).

La grande variété des adhésines sécrétées et assemblées par le système de chaperonne-placier fait de ce dernier un mode d'assemblage et de sécrétion des adhésines d'*E. coli* d'une importance capitale.

3.1.2 Le pili de type IV

Les adhésines sécrétées par le système homologue au système de sécrétion de type 2 chez *E. coli* sont désignées sous le nom de pili de type IV. Les pili de type IV sont des structures longues, flexibles et formés de sous-unités de piline polymérisées qui sont assemblées dans la membrane cytoplasmique puis exportées à travers la membrane externe jusqu'à la surface bactérienne via un système homologue au système de sécrétion de type 2. Ils peuvent être divisés en deux classes en fonction de leur longueur et de leur séquence en acides aminés: le type IVa et le type IVb. À l'heure actuelle, les membres appartenant à la classe du type IVb ne comprennent que des pathogènes possédant la capacité à infecter l'homme. Il existe différents pili de

type IV comme par exemple les longus pili des ETEC (64) et les bundle-forming pili (BFP) chez les EPEC (64, 167). L'exemple du BFP des EPEC est couramment utilisé afin d'illustrer les particularités du mode de sécrétion homologue au système de sécrétion de type 2. Le BFP est codé par un opéron constitué de 14 gènes désignés *bfpA* à *bfpL*, *bfpP* et *bfpU* dont l'unité majeure consiste en BfpA, aussi appelé bundline (134). La biogenèse est effectuée en trois étapes : le processing de la bundline, la formation du pilus et son extrusion. Les deux dernières étapes sont dépendantes de deux complexes protéiques, le complexe de membrane interne composé de BfpC, BfpD, BfpE et BfpF (28) et le complexe de membrane externe composé de la sécrétine BfpB et des protéines BfpG et BfpU (30). Les pili de type IV possèdent la capacité unique de se rétracter à l'intérieur de la paroi cellulaire de la bactérie tout en conservant leur extrémité solidement attachée à la cellule. Cette aptitude est à l'origine du mouvement spécialisé nommé twitching motility qui est observé lors du déplacement bactérien sur une matrice semi-solide (17, 27). Les pili de type IV sont des structures multifonctionnelles uniques permettant également l'adhésion aux cellules hôtes, la formation de microcolonies, la modulation des cellules ainsi que l'absorption des bactériophages.

3.1.3 La voie de nucléation/précipitation

Les curli sont de minces fimbriae de 6-12 nm de diamètre, de longueur irrégulière, agrégés à la surface de la bactérie sur une épaisseur de 0.5 à 1 nm (20). Ils sont présents chez de nombreux pathotypes d'*E. coli*, notamment chez les EHEC, où ils sont responsables de la formation des biofilms et de l'adhésion bactérienne. Ces adhésines possèdent un mode d'assemblage remarquable et inusité. En effet, les curli sont assemblés à l'extérieur de la bactérie grâce à l'action de protéines nucléatrices qui précipitent les sous-unités protéiques solubles à la surface bactérienne. La formation des curli nécessite deux opérons: l'opéron *csgBA* codant pour les composés structuraux et l'opéron *csgDEFG* (curli synthesis gene) codant pour les protéines nécessaires à la régulation, au transport des sous-unités et à la stabilisation des fibres (138). La lipoprotéine CsgG située dans la membrane externe constitue une partie intégrante du complexe de sécrétion nécessaire à la formation des curli. Ses fonctions

incluent l'export à la surface cellulaire de la sous-unité majeure CsgA (ou curline) et de son auxiliaire à la polymérisation CsgB ainsi que leur protection contre la protéolyse. La présence de CsgG à la surface cellulaire sert également de support à la formation des curli. Des études récentes portant sur la fonction des protéines CsgE et CsgF semblent leur attribuer le rôle de chaperonne et de nucléateur lors de l'assemblage du curli. La sécrétion de ces protéines faciliterait également le transport des protéines CsgA et CsgB à travers la membrane externe. La formation des curli est possible grâce au nucléateur CsgB, présent le long du filament, qui polymérise les sous-unités CsgA. Une fois assemblés à la surface bactérienne, les curli sont des structures stables et difficiles à dissocier (83).

3.2 Adhésines afimbriales

Les adhésines afimbriales se définissent comme des structures non-filamenteuses, formées le plus souvent d'une seule protéine monomérique ou oligomérique. Ces adhésines sont sécrétées de diverses manières à la surface de la bactérie (60, 117). Dans la majorité des cas, les adhésines demeurent liées à la membrane bactérienne mais certaines adhésines existent également sous une forme sécrétée.

3.2.1 Les adhésines membranaires

On peut citer comme adhésine membranaire la porine OmpA qui est une protéine de membrane externe, composée d'un tonneau β et de plusieurs boucles extracellulaires (129). OmpA possède plusieurs fonctions (155). La protéine purifiée peut se lier aux cellules endothéliales microvasculaires du cerveau et permettre ainsi aux *E. coli* responsables de méningite de traverser la barrière hémato-encéphalique (151). Les EHEC O157:H7 semblent aussi utiliser OmpA pour adhérer aux cellules épithéliales Hela et Caco-2 (168). OmpA est insérée dans la membrane externe par le système de biogénèse des protéines de la membrane externe, qui a fait l'objet d'une revue récente (15). Il existe d'autres protéines de membrane externe contribuant à l'adhésion d'*E. coli*. On peut citer la protéine Hek (hemagglutinin from *E. coli* K1) présente chez les

E. coli causant des méningites (43). Cette protéine permet l'adhésion et l'invasion aux cellules épithéliales ainsi que l'autoaggrégation. La protéine de membrane externe Tia (enterotoxigenic invasion protein A) des ETEC médie l'adhésion et l'invasion de cellules épithéliales gastrointestinales en se liant à un protéoglycane (54). Les EHEC possèdent aussi plusieurs protéines de la membrane externe qui contribuent à leur adhérence comme la protéine Saa (STEC autoagglutinating adhesin) (128) ou la protéine Iha (IrgA homologue adhesin) (165).

3.2.2 Adhésines reliées au système de sécrétion de type 3

Les EPEC et les EHEC possèdent la capacité de former des lésions de type attachant et effaçant se manifestant par l'attachement intime de la bactérie aux cellules hôtes, la formation d'un piédestal sur lequel repose la bactérie et l'effacement des microvillosités intestinales (55). La formation des lésions de type attachant et effaçant par la bactérie requiert la présence de l'îlot de pathogénicité appelé LEE (Locus of Enterocyte Effacement) codant pour une adhésine membranaire nommé intimine, son récepteur Tir (Translocated Intimine Receptor), le système de sécrétion de type 3 ainsi que pour de nombreux effecteurs (57, 119). L'attachement intime des EPEC et des EHEC à la surface de la cellule-hôte requiert la liaison de l'intimine avec son récepteur Tir. La protéine Tir a longtemps été considérée comme une protéine de l'hôte mais il s'agit en réalité d'une protéine bactérienne transloquée par le système de sécrétion de type 3 qui est intégrée dans la membrane de l'hôte. Cependant il est à noter que l'adhésine intimine n'est pas sécrétée par le système de sécrétion de type 3. Le système de sécrétion de type 3 permet l'injection de nombreux effecteurs bactériens, nommés Esp chez *E. coli*, dans le cytosol de la cellule hôte. Ces effecteurs interfèrent avec les métabolismes normaux de la cellule hôte modulant l'activité de cette dernière à l'avantage de la bactérie ce qui entraîne la formation des lésions de type attachant et effaçant.

Une autre protéine ayant une importance dans la formation des lésions de type attachant et effaçant est la protéine EspA. Son rôle en tant qu'adhésine est encore controversé (57, 119). EspA, sécrétée par le système de sécrétion de type 3, est une protéine particulière aux EPEC, qui forme un appendice filamentueux constituant le

pont entre l'extrémité de l'aiguille et la membrane de la cellule hôte (31). EspB et EspD sont deux autres protéines sécrétées par le système de sécrétion de type 3 qui forment un pore dans la membrane plasmique (150). EspA pourrait fonctionner comme une adhésine, soit en se liant au complexe EspB-EspD, soit en se liant directement à la cellule hôte (57, 119, 150, 167).

3.2.3 Les flagelles

Le rôle principal des flagelles est la motilité. Ils sont cependant considérés depuis peu comme des adhésines (63). Des souches EPEC mutées pour le gène structural du flagelle *fliC* sont en effet moins adhérentes à des cellules épithéliales en culture. Des flagelles purifiés sont aussi capables d'adhérer aux cellules, suggérant que les flagelles eux-mêmes ont des propriétés adhésives. De plus, la propriété d'adhésion des flagelles est indépendante de leur motilité (63). Les flagelles sont sécrétés par un système de sécrétion de type 3 qui diffère de celui des EPEC et qui a fait l'objet de nombreuses revues (6, 103).

3.2.4 Le système de sécrétion de type V

Plusieurs adhésines d'*E. coli* nécessitent l'action du système de sécrétion de type V pour leur présentation à la surface cellulaire. Le système de sécrétion de type V comprend le système des AT (système de sécrétion Va), le système à deux partenaires (système de sécrétion Vb) et le système des AT trimériques, parfois désignés Vc (74). La caractéristique commune à ces trois systèmes consiste en la translocation des protéines à travers la membrane externe par l'intermédiaire d'un pore transmembranaire formé par un tonneau β . Le système à deux partenaires est composé de deux protéines séparées dont TpsA constitue la protéine sécrétée et TpsB le domaine translocateur (Figure 4). En ce qui concerne les AT, ceux-ci contiennent les deux domaines dans une seule protéine. Dans le cas des AT conventionnels (Va), ces deux domaines sont monomériques tandis que chez les AT trimériques (Vc), le tonneau β est un homotrimère formé de 12 brins β dans lequel chaque monomère fournit 4 brins. Pour les trois classes du système de sécrétion de type V, le passage de la membrane interne est effectuée par le système *Sec* (74, 75).

3.2.5 Les autotransporteurs et l'adhésion

Les protéines AT peuvent conférer plusieurs fonctions à la bactérie telle que la protéolyse, la cytotoxicité, la résistance au sérum, l'adhésion et l'invasion (75, 126). Les AT possèdent une organisation structurale exclusive formée d'une séquence signal en N-terminal suivi d'un domaine passager qui sera transloqué à la surface cellulaire (correspondant à la fonction de la protéine), suivi d'un domaine de jonction et d'une unité de translocalisation en C-terminal (62). Le domaine de jonction, aussi appelé autochaperonne, occupe une fonction importante pour le repliement et la translocation du domaine extracellulaire (123). La sécrétion des AT est effectuées via le système de sécrétion de type Va et chez les bactéries Gram négatif, la sécrétion peut être divisée en trois étapes. La première étape consiste en le passage de la membrane interne via la machinerie de sécrétion Sec grâce à la présence du peptide signal situé dans la région N-terminale de l'AT (153). Une fois dans le périplasme, l'AT se replie par un processus qui semble dépendant des facteurs génétiques de l'hôte. Le repliement de l'AT serait très limité car celui-ci doit rester partiellement déplié pour permettre sa translocation. La dernière étape consiste en l'insertion de l'unité de translocalisation de l'AT dans la membrane externe suivit de la translocation du domaine passager à travers l'unité de translocalisation permettant ainsi la présentation de l'AT à la surface bactérienne (37, 38, 143).

Les AT possédant une fonction adhésive sont récapitulés dans le tableau 1 et ont fait l'objet d'une revue récente par notre laboratoire (62). Il est intéressant de noter que d'une part, les adhésines AT occupent souvent d'autres fonctions en plus de leur capacité à adhérer comme l'invasion ou l'autoaggrégation et que d'autre part, leurs substrats sont souvent non identifiés. Plusieurs AT conférant la capacité d'adhésion aux bactéries subissent une coupure à la surface cellulaire ce qui provoque la séparation de la partie extracellulaire de l'AT et du domaine passager (21). Cette coupure pourrait être avantageuse au niveau de la régulation de l'activité adhésive, c'est-à-dire que le contrôle de la protéolyse par le milieu extérieur pourrait promouvoir une adhésion optimale au bon endroit ainsi qu'au bon moment tout en

permettant de modifier la force de l'adhésion. Les AT adhérents consistent généralement en des protéines multifonctionnelles, il est donc probable que le relâchement de la partie extracellulaire puisse servir à augmenter les fonctions alternatives de ces AT. Finalement, la protéolyse et le relâchement pourrait en prévenir la reconnaissance immune de la bactérie par l'hôte dans le cas où ce dernier produit des anticorps dirigés contre la forme libre de l'adhésine (34, 62).

Il existe quatorze adhésines AT connues chez *E. coli* et cinq d'entre-elles font partie de la famille des SAAT (Self-Associating Autotransporters) qui regroupent les AT possédant une similarité de séquence et de propriété agrégatives (84). Les membres des SAAT sont AIDA-I, l'antigène 43 (Ag43), l'adhésine/invasine TibA (Toxigenic Invasion loci A), cah (calcium-binding ag43 homologue) et YpjA. Nous décrirons plus en détail AIDA-I puisqu'il s'agit du sujet d'étude du présent mémoire.

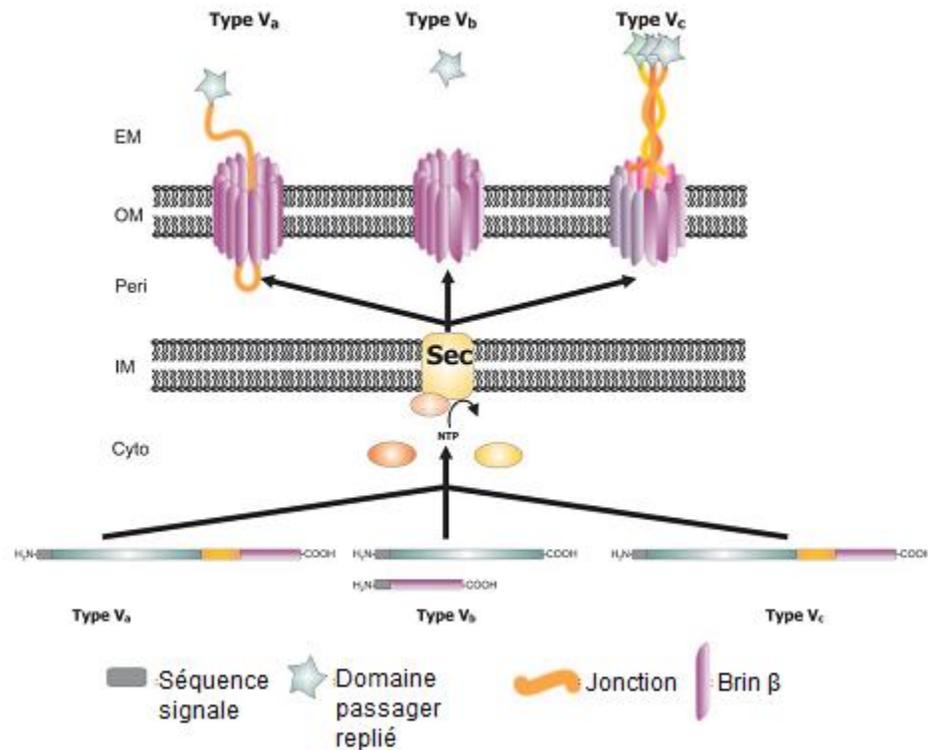


Figure 4. Représentation schématique du système de sécrétion de type V. Dans les trois cas, le passage de la membrane externe est effectué via la machinerie Sec et l'autotransporteur est présenté à la surface bactérienne suite à la traversée de la membrane externe via le tonneau β . Le système de sécrétion de type V est divisé en 3 sous-catégories : Va, Vb et Vc. Les autotransporteurs sécrétés par les systèmes Va et Vc possèdent leur domaine passager et leur domaine translocateur fusionnés à l'intérieur de la même protéine. Dans le cas du système Vc, ces deux domaines sont des homotrimères. Le système Vb est le système à deux partenaires pour lequel le domaine passager et le domaine translocateur sont situés sur deux protéines différentes. Adapté de Henderson and *al.*, 2004 (75).

Organisme	Adhésine ^a	Autres fonctions	Substrat ^c	Ref.
<i>Actinobacillus actinomycetecomitans</i>	EmaA		Col	(111)
	Omp100	Résistance au sérum, Invasion		(8)
	Aae			(49)
<i>Bartonella henselae</i>	BadA	Résistance à la phagocytose	Col, FN, L	(136)
<i>Bartonella quintana</i>	Vomps	Autoaggrégation	Col	(184)
<i>Bordetella pertussis</i>	Perctactin			(97)
	TcfA			(53)
	BrkA	Résistance au sérum, Invasion		(46)
<i>Campylobacter jejuni</i>	CapA	Invasion		(9)
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	Pmp21/PmpD			(181)
<i>Escherichia coli</i>	AIDA	autoprotéase, autoaggrégation,		(11)
	Ag43	Biofilm		(82)
	TibA	autoprotéase, autoaggrégation,		(100)
	Cah	Biofilm		(169)
	YpjA	autoaggrégation, Biofilm, Invasion		(141)
	YfaL	Biofilm		(141)
	YcgV	Biofilm		(141)
	Tsh/Hbp	Biofilm		(86)
	EheA	Biofilm		(182)
	EibA/C/D/E	Hémoglobine protéase	Ig	(144)
	RpeA	Biofilm		(99)
<i>Haemophilus ducreyi</i>	DrsA			(24)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Hap	Protéase, Autoaggrégation,	FN, L, Col	(50)
	Hia	Invasion		(89)
	Hsf			(159)
<i>Helicobacter pylori</i>	BabA		LewisB Ag	(77)
	SabA		S-LewisX	(104)
	AlpA		Ag	(120)
<i>Moraxella catarrhalis</i>	UspA1	Résistance au sérum	FN	(2)
	UspA2	Résistance au sérum	VN	(109)
	UspA2h			(92)
	Hag	Autoaggrégation		(130)
	McaP	Estérase, Phospholipase		(166)
<i>Neisseria meningitidis</i>	NadA	Invasion		(25)
	App	Protéase		(149)
	Nhha		L, HS	(146)
	MspA			(173)
<i>Rickettsiales</i>	rOmpA			(4)
	rOmpB	Invasion		(174)
<i>Salmonella enterica</i>	ShdA		Col, FN	(81)
	MisL	Invasion	Col, FN	(40)
<i>Yersinia enterocolitica</i>	YadA	Résistance sérum/phagocytose Autoaggrégation, Invasion	Col, L	(139)

Tableau 1 : Les adhésines autotransporteurs.

a : seules les protéines dont la fonction adhésive a été confirmée sont indiquées. Les autotransporteurs en gras appartiennent à la famille des SAAT.

b : C : autotransporteur conventionnel, T : autotransporteur trimérique.

c : Col : collagène. FN : Fibronectine. L : Laminine. VN : Vitronectine. HS : Heparan sulfate. Ig : Immunoglobuline Adapté de Girard and Mourez, 2006 (62).

3.3 Les adhésines non protéiques

3.3.1 Les lipopolysaccharides

Le rôle des lipopolysaccharides comme adhésines d'*E. coli* reste controversé. L'utilisation d'anticorps dirigés contre les antigènes O des LPS O111 et O157 diminue l'adhérence des EHEC à des cellules en culture. Cependant, la préincubation de cellules avec des LPS n'inhibe pas l'adhésion des EHEC, suggérant que les LPS ne sont pas des adhésines en tant que telles (161). De plus, des mutants O157:H7 déficients pour la synthèse de l'antigène O sont hyperadhérents. Ceci pourrait être dû à une modification globale de l'hydrophobicité de la membrane ou à une adhésion par des protéines qui étaient auparavant masquées par les lipopolysaccharides (58). L'hyperadhérence de ces mutants pourrait aussi être dû à l'implication du core du LPS dans l'adhésion, comme il a été montré pour *Actinobacillus pleuropneumoniae* (127). Ainsi, l'absence de la chaîne d'antigène O offrirait une meilleure présentation du core du LPS aux cellules, ce qui pourrait rendre les mutants hyperadhérents dans le cas d'une adhésion médiée par le core du lipopolysaccharide. Les lipopolysaccharides semblent aussi jouer un rôle dans la colonisation du tractus intestinal (105). Les lipopolysaccharides ont donc un rôle dans l'adhésion soit directement en tant qu'adhésine soit indirectement par leur implication dans la stabilité membranaire, l'hydrophobicité et le repliement des protéines de membrane externe. Leur biosynthèse est complexe et a fait l'objet de plusieurs revues (39, 171).

4.0 Les invasives d'*E. coli*

L'environnement extracellulaire intestinal est un milieu hostile à l'égard des bactéries. Ce milieu présente diverses caractéristiques mécaniques, chimiques et immunitaires représentant une menace pour les bactéries. Plusieurs espèces bactériennes ont développé diverses stratégies d'invasion afin de pénétrer à l'intérieur des cellules, là où elles sont partiellement protégées contre les agressions du milieu extérieur (29, 85). L'invasion des cellules-hôte peut être effectuée via deux

mécanismes : l'endocytose induite et l'invasion active. L'invasion par endocytose induite est engendrée par l'injection d'effecteurs bactériens dans une cellule-hôte afin de stimuler l'invasion dans les cellules non-phagocytaires. Lors de ce type d'invasion, la bactérie et la cellule-hôte sont actives (Figure 5). L'invasion engendrée par le système de sécrétion de type 3 constitue le mécanisme d'invasion par endocytose induite le mieux caractérisé. L'invasion active consiste en l'invasion de la cellule-hôte sans déclencher de mouvements contractiles chez la cellule-hôte. Ainsi, seule la bactérie est active lors de ce processus d'invasion (132, 142). Plusieurs pathogènes possèdent des invasines engendrant l'invasion des cellules hôtes, cependant, nous ne nous concentrerons que sur les principales invasines d'*E. coli*.

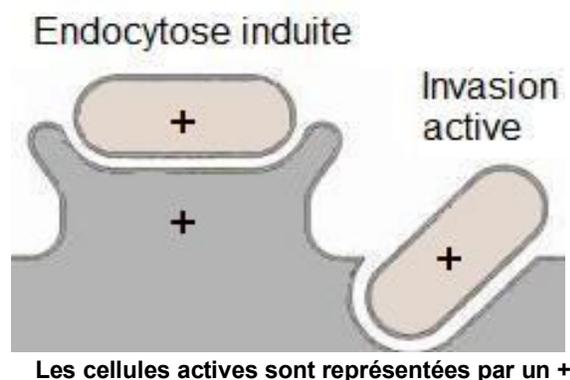


Figure 5. Routes d'invasion utilisées par les bactéries pour envahir une cellule-hôte. La phagocytose implique seulement l'activation de la cellule phagocytaire, l'endocytose induite requiert l'activation de la cellule bactérienne et de la cellule hôte tandis que l'invasion active ne requiert que l'activation de la cellule bactérienne. Adapté de la référence Russell, 2005 (142).

4.1 L'invasion par endocytose induite

4.1.1 Invasion engendrée par le système de sécrétion de type 3

Il est généralement accepté que les shigelles font partie intégrante du groupe des EIEC. (93, 148). L'invasion engendrée par les EIEC et les shigelles utilise le système

de sécrétion de type 3 qui fait appel à la translocalisation d'effecteurs capables de moduler le cytosquelette de la cellule hôte afin d'entraîner la formation d'une protusion qui, éventuellement, enferme la bactérie dans une vacuole. Chez les shigelles les effecteurs sécrétés sont IpaA, IpaB, IpaC, IpgB1, IpgB2, IpgD et VirA. Ces effecteurs sont impliqués dans l'invasion bactérienne (IpaA, IpaC, IpgB1, IpgD, VirA), la programmation de la mort cellulaire et l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule hôte (IpaB) ainsi que dans la survie de la bactérie dans la cellule hôte (IpgD) et la dispersion bactérienne de cellule à cellule (VirA) (29, 122, 148).

4.2 L'invasion active

L'adhésion d'une bactérie à une cellule hôte peut permettre à celle-ci d'engager différents récepteurs à la surface de la cellule. L'engagement de récepteur(s) par l'invasine permet de déclencher une cascade de signalisation qui entraîne la phosphorylation de protéines kinases et l'activation de réarrangements du cytosquelette. Chez *E. coli* de nombreuses invasines utilisent cette manœuvre pour envahir les cellules épithéliales citons par exemple le pilus de type I. Chez les UPEC, l'adhésion de la bactérie aux cellules de la vessie est effectuée via la liaison entre le pilus de type I et le monomannose de l'uroplaque 1a. Cette interaction active une cascade de signalisation qui résulte en l'invasion des bactéries dans la cellule (29, 83, 121). Des études ont démontré que l'invasion engendrée par le pilus de type I est dépendante de la présence de radeaux lipidiques au site d'entrée de la bactérie, ces derniers servant de plateforme pour le recrutement des molécules de signalisation (1, 183). Un autre exemple d'invasion active chez *E. coli* est illustré par les adhésines Afa. Les *E. coli* possédant une ou plusieurs adhésines Afa ne sont pas considérées comme des pathogènes invasifs au même titre que les salmonelles et les shigelles mais leur capacité à envahir les cellules épithéliales *in vitro* ainsi que des explants d'entérocytes porcins différenciés a été démontrée. Des expériences effectuées avec *E. coli* exprimant cette invasine ont démontré la capacité de cette dernière à promouvoir l'internalisation de la bactérie dans les cellules HeLa ainsi que dans des

cellules non-différenciées Caco-2 (29, 94). Le faible pourcentage d'invasion engendrée par AfaE/AfaD est compensé par la capacité de survie et de multiplication des bactéries invasives à l'intérieur des inclusions pendant plusieurs jours. L'invasion engendrée par AfaE/AfaD est indépendante de l'adhésion assurée par AfaE. Cependant, la concentration de protéines AfaD retrouvée chez la bactérie revêt une importance cruciale lors du processus d'internalisation. Ainsi, l'invasion engendrée par les adhésines Afa des ExPEC pourrait entraîner la formation de niches intracellulaires qui permettraient aux bactéries de persister et de créer un réservoir chez l'hôte à partir duquel elles pourraient redémarrer le processus d'infection (95). Il existe plusieurs autres invasines utilisant l'invasion active comme mécanisme d'invasion chez *E. coli*, citons par exemple les invasines Ipa des EIEC permettant l'invasion des cellules épithéliales intestinales et qui sont codées par le plasmide Ipa, les hémagglutinines Dr, Dr-II des ExPEC qui permettent l'invasion des cellules épithéliales ainsi que les AT possédant une fonction invasive (29, 94).

4.2.1 Les autotransporteurs et l'invasion

Certains AT d'*E. coli* possèdent la capacité de promouvoir l'invasion des cellules hôtes tels que TibA (42), Ag43 (47) et AIDA-I (21). Les bactéries exprimant les AT semblent utiliser le mécanisme de l'invasion active pour pénétrer les cellules épithéliales, cependant, la cascade de signalisation menant à l'internalisation n'est pas définie. Toutefois, des études ont démontré clairement que l'AT TibA permet l'invasion des cellules épithéliales en culture (42) et que la présence d'Ag43 à la surface bactérienne augmentait l'absorption des bactéries à l'intérieur des neutrophiles (47). Également, des études effectuées sur l'AT AIDA-I ont démontré la capacité de celle-ci à promouvoir l'invasion dans les cellules épithéliales. Une étude effectuée sur AIDA-I a démontré que le mécanisme d'adhésion de cette protéine n'est pas tout à fait le même que le mécanisme d'invasion. En effet, dans cette étude, les auteurs ont créé des variants d'AIDA-I possédant une capacité d'adhésion amoindrie sans affecter la capacité d'invasion de la bactérie porteuse et vice versa (22).

5.0 Récepteurs reconnus par les adhésines/invasines bactériennes

L'adhésion et l'invasion des cellules hôte sont considérées comme des processus intimement liés. L'adhésion et l'invasion bactériennes peuvent être engagées directement c'est-à-dire via l'interaction de molécules présentes à la surface de la cellule, ou indirectement, c'est-à-dire via l'attachement de l'adhésine à un facteur soluble servant de «pont» entre la bactérie et la cellule de l'hôte (52). La grande diversité des molécules se retrouvant à la surface des cellules constituent des cibles de choix pouvant être utilisées comme récepteur par les pathogènes lors de l'adhésion et l'invasion (16, 70, 133). Les molécules reconnues par les adhésines et invasines bactériennes peuvent être classées en catégories dont les deux plus importantes sont les composés d'adhérence des cellules eucaryotes et les molécules glycosylées. Il existe également de nombreuses autres catégories citons par exemple les radeaux lipidiques, les lectines et les contre-récepteurs des intégrines. La revue qui suit décrit les principales catégories de récepteurs cellulaires reconnus par les adhésines et invasines bactériennes, sans limitation au groupe des *E. coli*.

5.1 Composantes d'adhérence des cellules eucaryotes

5.1.1 Composantes de la matrice extracellulaire

Les composantes de la matrice extracellulaire constituent un ensemble de molécules retrouvées à la surface cellulaire occupant diverses fonctions allant du support et de l'ancrage de la cellule à la régulation des communications intercellulaires. Plusieurs molécules de diverses natures sont regroupées dans ce groupe, citons par exemple la laminine, la fibronectine et les différents types de collagènes (133). Plusieurs adhésines et invasines d'*E. coli* possèdent la capacité de lier les composantes de la matrice extracellulaire. Les curli possèdent la capacité de lier certaines composantes de la matrice extracellulaire tels que la laminine et la fibronectine en plus de nombreuses protéines sériques (ex : plasminogène) et tissulaires humaines (ex : complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) ce qui contribue à augmenter la virulence des souches (52, 83). Certains variants du pili de type I possèdent

également la capacité d'interagir avec quelques composantes de la matrice extracellulaire : la laminine, la fibronectine et le collagène de type IV et V (83). Il a aussi été reporté que l'hémagglutinine Dr peut lier le collagène de type IV (94, 95). Il existe également d'autres molécules de la matrice extracellulaire, notamment différents types de collagène, la fibronectine et la laminine qui peuvent être utilisées par les pathogènes comme récepteur direct. Puisqu'il existe plus de 25 types de collagène, les diverses adhésines peuvent utiliser différents type de collagène comme récepteur cellulaire afin, par exemple, de conférer un tropisme cellulaire aux pathogènes. Citons par exemple le fimbriae de type III de *Klebsiella pneumoniae* qui reconnaît spécifiquement le collagène de type IV et V (133). La fibronectine est une protéine ubiquitaire de la matrice extracellulaire qui est essentielle à l'adhésion de tous les types de cellules eucaryotes. Cette molécule est recrutée lors de l'adhésion par 16 espèces bactériennes dont *Staphylococcus aureus* et certains streptocoques (71, 117, 121). La laminine est un constituant de la membrane basale des cellules qui peut être exposée lorsque les tissus sont endommagés ou inflammés. Certains pathogènes tels que *Pseudomonas aeruginosa*, *Helicobacter pylori* ainsi que certains streptocoques expriment des adhésines possédant la capacité de lier la laminine augmentant ainsi leur chances d'engager le processus d'infection lorsque la barrière cutanée de l'hôte est endommagée (133).

Certaines molécules de la matrice extracellulaire sont également liées indirectement lors de l'adhésion et l'invasion de certains pathogènes. Il est intéressant de mentionner le cas des streptocoques de groupe A qui peuvent lier le collagène via l'interaction de la fibronectine (117, 133). Citons également l'exemple du protéoglycan qui possède la capacité d'interagir directement avec les molécules de la matrice extracellulaire. Le protéoglycan est une molécule impliquée dans les mécanismes de l'adhésion cellulaire, de la croissance des cellules, du contrôle des voies protéolytiques et lipolytiques. Certains pathogènes tels que *Plasmodium*, *Leishmania* et *Trypanosoma* utilisent les protéoglycans ainsi que les molécules avec lesquelles ils interagissent afin de promouvoir leur invasion dans les tissus de l'hôte (133).

Les intégrines sont des récepteurs présents à la surface apicale et basolatérale des cellules qui sont impliquées dans les échanges de signaux entre le milieu extracellulaire et le cytosquelette de la cellule. Ils sont, de ce fait même, impliqués dans les processus de signalisation cellulaire et permettent l'attachement des cellules aux tissus et entrent également en relation avec des composantes de la matrice extracellulaire tels que la fibronectine, la laminine et le collagène. Certains pathogènes favorisent l'utilisation de ces molécules en tant que récepteurs puisque le contact direct entre les intégrines et le cytosquelette permet à la bactérie adhérente de manipuler la machinerie de l'hôte afin de promouvoir l'entrée subséquente de la bactérie dans la cellule hôte (16, 70, 71). C'est le cas du pili de type I des UPEC qui possède la faculté de lier les intégrines $\alpha 3$ et $\beta 1$ présentes sur les cellules épithéliales urinaires (29). Il a été rapporté que certaines intégrines basolatérales semblaient également jouer un rôle lors du processus d'infection. En effet, l'invasine AfaD utilise les intégrines $\beta 1$ comme récepteur. Ces intégrines sont retrouvées à la surface basolatérale des cellules, ce qui nous amène à nous poser des questions sur leur accessibilité lors de l'infection. Des observations suggèrent que les intégrines $\beta 1$ sont présentes au site d'interaction entre bactérie-cellule (94, 167). Ce phénomène, combiné à la possibilité de présentation des intégrines basolatérales dans les tissus endommagés ou enflammés, pourrait expliquer l'utilité de la reconnaissance de l'intégrine basolatérale $\beta 1$ par AfaD.

5.1.2 Les sucres et les molécules glycosylées

La surface des cellules est majoritairement recouverte de molécules glycosylées de diverses natures et ces molécules représentent une cible de choix pour l'adhésion des pathogènes. Citons l'exemple de l'adhésine FimH du fimbriae de type I qui reconnaît et lie le mannose et les oligosaccharides de mannose via un mécanisme semblable aux lectines (117). Le fimbriae de type I des UPEC lie l'uroplaqueine Ia et Ib, deux glycoprotéines des cellules urothéliales riches en mannose (29, 83). L'étude de l'affinité de liaison entre FimH et l'oligomannose a démontré que l'affinité FimH - récepteur varie en fonction des espèces bactériennes. De plus, l'analyse des variants de l'adhésines FimH a démontré que le tropisme tissulaire et l'affinité entre FimH et

son récepteur sont dus à des variations dans la structure primaire de l'adhésine (7, 83, 157). Il a également été démontré que l'affinité FimH - récepteur est affectée par la nature du filament à partir duquel l'adhésine FimH est présentée. De plus, l'analyse de FimH chez les isolats d'*E. coli* commensaux a démontré que dans ceux-ci, FimH possède une faible affinité pour les résidus de monomannose mais une forte affinité pour les structures complexes de mannoses. Contrairement aux souches commensales, les UPEC possèdent une forte affinité pour les deux types de cible, ce qui pourrait expliquer en partie leur pouvoir pathogène (5, 156). D'autres *E. coli* pathogènes utilisent un récepteur glycoprotéique précis pour contrôler leur tropisme cellulaire, citons par exemple les adhésines Afa/Dr des DAEC. Les adhésines Afa/Dr reconnaissent l'antigène Dr à la surface du DAF, une glycoprotéine qui n'est retrouvée qu'à la surface des cellules hématopoïétiques, intestinales, urinaires et endothéliales. La densité de DAF présente à la surface des cellules est dépendante du type cellulaire et présente des caractéristiques de spécificité d'hôte. Ainsi, les souches DAEC lient cette glycoprotéine via les adhésines Afa/Dr présentent un tropisme cellulaire. Chez l'homme, les adhésines Afa/Dr de la bactérie permettent l'attachement aux cellules intestinales (94, 121). Une accumulation importante de DAF est observable *in vitro* sous la bactérie suite à son attachement à la cellule intestinale. D'autres adhésines/invasines telle que l'hémagglutinine Dr et AfaE-III, utilisent des glycoprotéines biliaires en tant que récepteurs (95). Plusieurs autres adhésines d'*E. coli* utilisent des molécules glycosylées pour leur adhésion, citons par exemple le pili P liant les Gal α (1-4)Gal β globosides des glycolipides des cellules des reins, le pili de type IV qui reconnaît le N-acetyl-lactosamine à la surface des cellules de l'hôte et plus récemment les adhésines CFs pour lequel des études ont démontré une interaction entre le CFA/I et les carbohydrates contenus dans les glycosphingolipides non-acides ainsi que dans les glycoprotéines.

Les récepteurs CEACAM constituent une famille de protéines glycosylées retrouvés à la surface des cellules, en particulier à l'intérieur des radeaux lipidiques, qui sont impliqués dans les interactions cellule-cellule. Il a été démontré qu'une sous-catégorie des fimbriae Afa-Dr, comprenant l'adhésine Dr, F1845 et AfaE-III, possède la capacité d'interagir avec ces récepteurs. L'interaction entre une bactérie et les

CEACAM entraîne l'activation de CDC42 ce qui provoque une augmentation de la concentration des CEACAM sous la bactérie adhérente et entraîne l'effacement des microvillus (29). Il existe de nombreux autres exemples d'adhésines et d'invasines utilisant des molécules glycosylées en tant que récepteurs mais nous nous limiterons ici à ceux illustrés précédemment.

5.2 Autres récepteurs reconnus par les adhésines/invasines

5.2.1 Les radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques sont des micro-domaines enrichis en cholestérol et en sphingolipides présents à la surface des cellules. Plusieurs études effectuées sur l'invasion bactérienne ont noté la présence d'une accumulation importante de radeaux lipidiques au point d'entrée de la bactérie. Ce phénomène pourrait suggérer une implication des radeaux lipidiques lors du processus d'invasion. Plusieurs études ont été effectuées afin de déterminer le rôle exact des radeaux lipidiques lors des mécanismes d'adhésion et d'invasion bactérienne. Il semble que les radeaux lipidiques jouent un rôle important lors de l'adhésion de diverses bactéries; dont les EPEC, les DAEC et les shigelles. Cependant, jusqu'à présent, aucune étude n'a caractérisé en profondeur les mécanismes d'invasion impliquant les radeaux lipidiques et une certaine controverse quand à leur rôle exact lors de l'invasion persiste (1, 29, 91).

5.2.2 Les lectines

Les lectines sont divisées en deux catégories selon leur fonctionnalité et leur structure de liaison aux carbohydrates. Les lectines de type C sont dites dépendantes du calcium et sont des protéines extracellulaires solubles ou ancrées dans la membrane. Lors de l'adhésion bactérienne, l'interaction est effectuée entre la lectine de type C multimérique et les complexes saccharidiques complémentaires à la surface de la bactérie. La lectine de type S comprend de nombreuses protéines solubles qui sont caractérisées par leur affinité avec le lactose ou autres β -galactoside. Elles sont

composées de deux sous-unités capables de lier les glucides. Ces sous-unités peuvent servir de pont entre la bactérie et les carbohydrates de la cellule. Citons l'exemple de l'attachement de *Pneumocystis carinii* et de *S. aureus* aux épithéliums ou aux macrophages alvéolaires, respectivement, qui est effectué via les domaines lectines de type C des collectines et les carbohydrates bactériens (133).

5.2.3 Les contre-récepteurs des intégrines

Les contre-récepteurs des intégrines comprennent les ICAM-1, les VCAM-1, la E-selectine, CD36 et CD44. Certaines bactéries possèdent la capacité d'utiliser ces protéines ancrées dans le cytosquelette comme récepteur direct tandis que d'autres interagissent avec des protéines d'adhésion ou des polysaccharides sécrétés par l'hôte avant de lier ces contre-récepteurs des intégrines. Citons l'exemple de *Haemophilus influenzae* non typique qui adhère aux cellules épithéliales respiratoires via la liaison aux ICAM-1 (133).

5.2.4 Les molécules sériques : les apolipoprotéines

Le sérum contient de nombreuses molécules diverses et variées dont les apolipoprotéines (48, 152, 162). Les apolipoprotéines sont une famille de protéines reliées entre elles par leur capacité à lier les lipides. Il existe une grande variété d'apolipoprotéines dont les plus communes sont les apolipoprotéines A-I, A-IV, B, C, D et E. La nomenclature sous forme d'alphabet des apolipoprotéines a été introduite en 1982 par Alaupovic. Cette nomenclature désigne l'apolipoprotéine sous la forme d'une lettre majuscule qui est suivit d'un chiffre romain représentant les différents polypeptides de cette apolipoprotéine. Finalement, la présence de polymorphisme de l'apolipoprotéine est indiquée par la présence d'un chiffre arabe accolé au chiffre désignant le polypeptide. La désignation alphabétique des apolipoprotéines a été attribuée selon l'ordre de leur découverte ainsi que selon le type de vésicules lipidiques à l'intérieur desquels elles sont retrouvées (3).

Le rôle principal des apolipoprotéines consiste à transporter des lipides et des diverses molécules hydrophobes dans le sang sous forme de vésicules lipoprotéique. Ces vésicules sont divisées en 4 classes selon leur composition et leur densité :

chylomicrons, VLDL (Very Low Density Lipoproteins), LDL (Low Density Lipoproteins) et HDL (High Density Lipoproteins). L'apolipoprotéine A-I présente dans la circulation sanguine est associée à deux types de vésicules lipoprotéiques spécifiques: les chylomicrons et les vésicules HDL. Parmi les 4 classes de vésicules lipoprotéiques, les chylomicrons sont les particules les plus imposantes, mesurant de 100-500 nm, mais possédant une faible densité. Ils sont composés principalement de triacylglycérols (près de 90% du poids total) et leur contenu en apolipoprotéines constituent environ 1% de leur composition. Les principales apolipoprotéines sont l'apolipoprotéine A-I (20% du contenu protéique), l'apolipoprotéine B-48 et l'apolipoprotéine A-IV. Les chylomicrons sont impliqués lors du transport des lipides diététiques et de certaines vitamines insolubles dans l'eau. Par conséquent, ce sont les particules les plus sécrétées dans la circulation sanguine par l'intestin. Contrairement aux chylomicrons, les vésicules HDL possèdent une densité élevée et sont les plus petites vésicules lipoprotéiques (mesurant de 6 à 12.5 nm). Ces particules contiennent plusieurs apolipoprotéines : l'apolipoprotéine A-I (majoritaire), A-II (deuxième en importance), A-IV, C-I, C-II, C-III, D et E. Ces particules sont riches en phospholipides et sont impliquées dans le transport du cholestérol et des cholestéryl ester. Ces deux molécules sont des composés de la membrane plasmique et elles peuvent être utilisées dans le métabolisme oxydatif, le métabolisme des sels biliaires et en tant que précurseur d'hormones (48, 152, 162).

L'étude spécifique de l'apolipoprotéine A-I démontre que celle-ci est commune à une grande variété d'espèces animales dont l'homme. La synthèse de cette apolipoprotéine de 28.3 kDa est effectuée en trois étapes à l'intérieur du foie et de l'intestin. L'apolipoprotéine A-I est initialement synthétisée sous la forme d'une pré-pro-apolipoprotéine de 267 acides aminés comprenant une séquence signal dans le domaine N-terminal. La coupure de 18 acides aminés dans la séquence signal entraîne le relâchement de la pro-apolipoprotéine. La dernière étape de la synthèse consiste en la modification de la pro-apolipoprotéine par une protéase qui permet le relâchement de l'apolipoprotéine A-I mature. Suite à sa synthèse, l'apolipoprotéine

A-I est sécrétée dans le lumen de l'intestin ainsi que dans la circulation sanguine sous forme de vésicules lipidiques (98, 162).

6.0 L'autotransporteur AIDA-I

AIDA-I a été découverte en 1989 chez la souche *E. coli* 2787 isolée d'un cas de diarrhée infantile (12). Les auteurs de cette première étude transformèrent des *E. coli* C600 avec des fragments d'ADN plasmidique provenant de la souche 2787 et examinèrent la capacité des transformants à adhérer de manière diffuse. Ils définirent ainsi la région responsable du phénotype d'adhérence diffuse comme un fragment de 6 kb provenant du plus grand des deux plasmides de la souche et baptisèrent la protéine membranaire codée par ce fragment AIDA-I pour « Adhesin Involved in Diffuse Adherence ». L'obtention par la suite de la séquence nucléotidique d'AIDA-I montra que le fragment de 6 kb codait en réalité pour deux protéines de 45 kDa (orfA) et de 132 kDa (orfB), qui furent identifiées comme étant la glycosyltransférase désignée aah pour « adhesin aida heptosyltransférase » (14) et le précurseur de AIDA-I (11, 13). L'heptosyltransférase Aah glycolyse AIDA-I en utilisant des précurseurs provenant de la biosynthèse des lipopolysaccharides. La glycosylation est une étape essentielle pour le phénotype d'adhésion et la conformation normale de l'AT. Cependant, cette étape n'est pas requise pour les phénotypes d'autoaggrégation et de formation de biofilms.

L'AT AIDA-I est initialement synthétisé sous la forme d'une pré-pro-protéine d'environ 132 kDa possédant une organisation modulaire (163). AIDA-I est modifié post-transcriptionnellement par l'heptosyltransférase Aah via l'addition de résidus heptoses sur une thréonine et sur 15 sérines. La région N-terminale de la pré-pro-protéine correspond à une séquence signal sec-dépendante de 49 acides aminés. Le passage de la pré-pro-protéine à travers la membrane interne est possible grâce à cette séquence signal qui dirige la pré-pro-protéine vers la machinerie de sécrétion Sec. Après la traversée de la membrane interne, la séquence signal est coupée afin de

permettre le relâchement de la pro-protéine dans le périplasma. La pro-protéine est ensuite insérée dans la membrane externe, présentée à la surface puis coupée probablement par un mécanisme autocatalytique (21, 163). La protéine possède deux domaines: le domaine α nommé AIDA-I mature (100 KDa) situé en N-terminal et attaché de façon non-covalente à la surface de la bactérie ainsi que le domaine β nommé AIDAc (45 KDa) situé en C-terminal et ancré à l'intérieur de la membrane externe. Ce dernier formerait un pore dans la membrane externe qui pourrait servir de conduit de translocation pour AIDA-I mature (21, 163) (Figure 6)

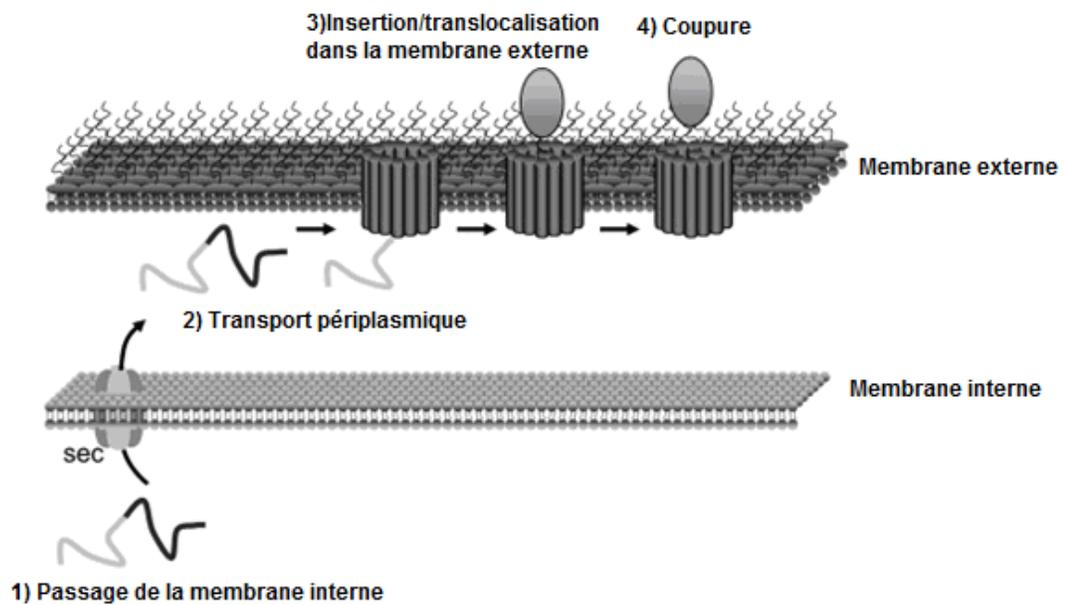


Figure 6. Représentation schématique de la translocalisation et de la présentation de l'AT AIDA-I. Adapté de Rutherford et Mourez, 2006 (143).

6.1 Prévalence d'AIDA-I dans les souches d'*E. coli* pathogènes

Le développement d'une pathologie chez l'hôte peut être accompli par *E. coli* exprimant AIDA-I à sa surface en combinaison avec d'autres facteurs de virulences telles les toxines (135). L'analyse des nombreuses souches d'*E. coli* pathogènes appartenant aux pathotypes DAEC, ETEC, EPEC et STEC a permis d'identifier AIDA-I dans certaines de ces souches (12, 65, 118). L'observation d'une fréquence plus élevée de la présence d'AIDA-I chez les isolats d'*E. coli* pathogènes provenant du porc confirme l'existence d'un réservoir animal pour cette adhésine.

Une corrélation entre *E. coli* exprimant AIDA-I et le développement de la MO et de la DPS a été démontrée chez le porc. Par exemple, une étude sur 104 souches isolées de porcs montre une prévalence élevée de souches possédant AIDA-I (25%) et une association significative entre la présence du gène intact d'AIDA-I et le développement de MO-DPS. De même, des délétions dans le gène codant pour AIDA-I sont associées avec l'absence de la diarrhée (118). Une autre étude sur 604 souches isolées de porcs malades montre que 7 d'entre elles possèdent AIDA-I (65). Parmi les souches positives pour AIDA-I, 11% possèdent aussi des gènes codant pour la toxine EAST1, 50% possèdent des gènes codant pour Stx et 40% des gènes pour le fimbriae F18, ce qui montre qu'AIDA-I est souvent associée avec d'autres facteurs de virulence (65). Certains pathotypes d'*E. coli*, comme AIDA-I:STb:EAST1 ou AIDA-I:STb, ne se retrouvent que chez les porcs atteints de diarrhée (116). Plusieurs études récentes ont démontré qu'un pourcentage significatif d'*E. coli* isolés du porc possédaient AIDA-I. En effet, une étude réalisée par Ngeleka et *al.* au Canada en 2003 a démontré que 20.5% des porcs présentant une diarrhée possédaient les gènes codant pour AIDA-I (116). Une autre étude par Zhang et *al.* en 2007 a démontré que cette proportion était de 26.9% au Etats-Unis (185). Cependant, d'autres études menées dans divers pays ont démontré que la prévalence d'AIDA-I n'était pas aussi élevée. En 2009, une étude réalisée en Chine par Zhao et *al.* démontre que 6.5% des isolats de *E. coli* des porcelets atteints de la MO ou de DPS possédaient le gène

AIDA-I (187). Le tableau II résume les principales études effectuées sur la prévalence d'AIDA chez le porc atteint de diarrhée.

Chez les humains, la prévalence des DAEC et le rôle d'AIDA-I dans la pathogénèse ne sont pas clairs. Dans une étude au Brésil sur 40 enfants atteints de diarrhée, 10% des souches présentaient un phénotype d'adhérence diffuse mais aucune ne possédait AIDA-I (145). Une autre étude en France sur 335 souches d'*E. coli* isolées de cas sporadiques de diarrhée montrent que seulement 4% des souches possèdent AIDA-I (78).

Pays	Nombre d'isolats de diarrhée	Nombre de souches AIDA+	% de souches AIDA+	Réf
Canada	170	15	9	(93)
USA	304	82	27	(151)
Chine	320	21	6,5	(152)
Allemagne	44	18	41	(95)
Corée	604	45	7	(53)
Belgique	174	110	63	(84)

Tableau II: Exemples d'études montrant la prévalence d'AIDA-I chez des souches porcines isolées de diarrhée.

7.0 Étude sur AIDA-I

7.1 Étude sur le récepteur d'AIDA-I

La présence de l'AT AIDA-I en combinaison avec d'autres facteurs de virulence, en particulier des toxines, dans les DAEC, EPEC et ETEC entraîne le développement de deux maladies chez le porcelet : la MO et la DPS. Ces deux pathologies peuvent entraîner de graves séquelles chez les animaux atteints. Il y a donc un intérêt du point de vue de la santé de l'animal et économique du point de vue des producteurs à tenter d'éliminer ou, à tout le moins, de diminuer la fréquence d'apparition de ces pathologies. Puisque l'adhésion est considérée comme une étape primordiale lors de l'établissement d'une infection, une méthode pouvant être envisagée serait

d'empêcher l'adhésion des bactéries pathogènes à l'intestin de l'animal. Pour ce faire, il est nécessaire d'identifier le récepteur de l'adhésine AIDA-I. Deux études indépendantes ont été menées afin d'isoler les récepteurs potentiels d'AIDA-I. L'équipe Laarmann et Schmidt (90) a identifié une glycoprotéine de 119 kDa de la membrane des cellules épithéliales tandis que l'équipe de Fang *et al.* (45) a isolé deux protéines distinctes du mucus intestinal. La première protéine consiste en une protéine nucléaire ou cytoplasmique de 120 kDa et la deuxième est une protéine de nature inconnue de 65 kDa. Malheureusement, aucune de ces deux études n'a effectué d'expériences avec les protéines purifiées afin de déterminer et caractériser le niveau d'interaction entre AIDA-I et le récepteur potentiel. De plus, aucune étude n'a été effectuée afin de caractériser l'importance de cette interaction lors des processus d'adhésion, d'invasion, d'autoaggrégation et de formation de biofilms.

Des études précédentes ont démontré la capacité de nombreux pathogènes exprimant des AT à utiliser des molécules contenues dans le sérum pour adhérer à la surface des cellules épithéliales. Il est connu que le sérum contient de nombreuses molécules dont les précurseurs de la matrice extracellulaire, des protéines, des sucres, des lipides, des immunoglobulines, etc. Les pathogènes peuvent utiliser les molécules du sérum soit comme récepteur direct à la surface cellulaire ou comme récepteur indirect, un «pont» permettant de réduire l'espace séparant la bactérie de la cellule cible. Le présent mémoire se concentre sur l'isolement, à partir du sérum porcin, de récepteur(s) potentiel(s) pour l'AT AIDA-I.

7.2 Étude de l'invasion *in vitro* conférée par AIDA-I

Plusieurs membres des SAAT présents chez *E. coli*, dont TibA, confèrent le phénotype d'invasion des cellules épithéliales en culture. Il a été démontré que l'AT AIDA-I permettait l'adhésion, l'autoaggrégation et la formation de biofilm. Un certain phénotype d'invasion est également observé en laboratoire chez les bactéries exprimant AIDA-I. La capacité d'invasion et de survie à l'intérieur des cellules épithéliales présente de nombreux avantages pour la bactérie : camouflage contre les

défenses de l'hôte, protection contre les agressions mécaniques et chimiques, capacité à recréer rapidement l'infection et capacité à se créer un réservoir. L'étude présentée en annexe de ce mémoire se concentre sur le phénotype d'invasion *in vitro* engendré par les *E. coli* exprimant AIDA-I ainsi que sur l'avantage qui pourrait être retiré de ce phénotype. La capacité d'AIDA-I à engager l'invasion de cellules épithéliales en culture sera étudiée ainsi que le rôle potentiel d'AIDA-I lors de la survie des bactéries à l'intérieur de la cellule hôte.

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

ARTICLE 1

The apolipoprotein A-I interacts with the adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) of *Escherichia coli*: involvement in the adhesion and invasion process.

Mélissa René¹, Victoria Girard¹, Frédéric Berthiaume¹, Mark Hancock² and Michaël Mourez^{1*}

¹Canada Research Chaire on Bacterial Animal Diseases, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, St-Hyacinthe, 3200 Sicotte, St-Hyacinthe, Québec, J2S 7C6

²Sheldon biotechnology center, McGill University, 3773 University Street, Montréal, Québec, H3A 2B4

Running title: The apolipoprotein A-I interacts with the AIDA-I autotransporter.

Keywords: Autotransporter, AIDA-I, *Escherichia coli*, Bacterial adhesin, Adhesion, Apolipoprotein A-I

*Corresponding author : Michaël Mourez, Université de Montréal, Faculté de médecine vétérinaire, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe, J2S 7C6, Quebec, Canada.
Phone : (450) 773 8521 ext 8430. Fax : (450) 778 8108.

Soumission à venir

ABSTRACT

In the present report, we isolated a potential receptor for the autotransporter AIDA-I from porcine serum. An interaction between the porcine serum and AIDA-I was shown by ELISA. We carried out porcine serum fractionation by ion exchange chromatography followed by gel filtration as to isolate potential(s) receptor(s). The presence of the potential(s) receptor(s) in the various fractions was monitored by ELISA. We also used an affinity chromatography assay to isolate potential(s) receptor(s) from whole or boiled porcine serum. Analyses of samples were conducted by fingerprint mass spectrometry. Both techniques succeeded to isolate a potential receptor from porcine serum: the apolipoprotein A-I. The interaction between purified apolipoprotein A-I and AIDA-I was shown by ELISA. Further investigation also showed a colocalization between adhered bacteria and apolipoprotein A-I on Hep-2 cells.

INTRODUCTION

The Adhesin Involved in Diffuse Adherence (AIDA-I) is a bacterial adhesin associated with certain pathogenic *Escherichia coli* strains. AIDA-I is a surface-displayed autotransporter that belongs to the self-Associating Autotransporter (SAAT) family because of its capacities to autoaggregate and form biofilms, in addition to its adhesive function. The adhesion, as the initial step in infection, is considered as an important step in the development of a disease. The adhesion of a bacteria to epithelial cells can be mediated directly by binding proteins at the cell surface or can be mediated by the use of an intermediate molecule acting as a bridge to lessen the space separating the bacteria from its target cell.

Edema disease (ED) and post-weaning diarrhoea (PWD) are recurrent threats to the swine industry and their frequent occurrence forces a major economical constraint upon the industry. These diseases are caused by *Escherichia coli* and they principally occur throughout the two weeks following weaning of the piglet. The OD is

principally cause by *E. coli* adhering to the small intestine by the fimbriae F18 and expressing Shiga-toxin 2e (Stx2e) (73, 112, 172). The PWD is mainly cause by *E. coli* adhering to the jejunum and ileum by diverse attaching factors (ex. F4, F18) and expressing one or more enterotoxins (STa, STb, LT, EAST1) (36, 56, 65, 66, 68, 118, 160, 179). Several studies have established the prevalence of an assortment of virulence factors in *E. coli* isolated from piglets affected by ED or PWD. One of these virulence factor is the adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) (12, 65, 118). In 2007, a study conducted in the United States by Zhang et al., demonstrated that 26.9% of pig affected by PWD had genes coding for the AIDA-I adhesin (185). Furthermore, several other studies have demonstrated various occurrence of the AIDA-I gene in piglet with ED or PWD worldwide (12, 65, 68, 78, 116, 118, 145, 185, 187).

AIDA-I has been isolated in 1989 from the outer membrane of a Diffusely Adherent *Escherichia coli* (DAEC) (12). Subsequently, it has been observed that AIDA-I, often in association with the bacterial toxin STb, is an important virulence factor that contributes to the development of severe diarrhea in piglet (135). Along with Ag43 and TibA, AIDA-I is an autotransporter (AT)ut from the Self-Associating Autotransporters family (SAAT). The members of the SAAT family mediate various virulence phenotypes such as adhesion, invasion, autoaggregation and biofilm formation (84). Adhesion, as the initial step in infection, is thought to be important in the development of a disease. In the past years, two independent studies have investigated and identified potential receptors for AIDA-I. Laarmann and Schmidt isolated and identified a glycoprotein of 119 kDa from epithelial cell membrane of HeLa cells (90). Fang and al. isolated a nuclear or cytoplasmic protein of 120 kDa and a protein of unknown nature of 65 kDa from the intestinal mucus (45). However, these two studies have not characterized the interaction between AIDA-I and the purified receptor. Furthermore theses studies have not carefully investigated the importance of the receptor/AIDA-I interaction during adhesion, invasion, autoaggregation or biofilm formation process.

Pathogens can directly bind proteins to adhere to the cell surface or can use an intermediate molecule as a bridge to lessen the space separating them from their target cell. Previous works have demonstrated that a variety of pathogens expressing AT can use extracellular matrix (ECM) proteins in order to adhere to epithelial cells (40, 51, 62, 72, 81, 86, 111, 136, 146, 176, 184). Serum is known to contain a wide range of molecules including extracellular matrix proteins precursors, proteins, sugar, lipids, immunoglobulins, etc. Here, we have isolated and identified a receptor for the AIDA-I AT into the porcine serum. We have isolated the apolipoprotein A-I from porcine serum by two different ways namely affinity chromatography and serum fractionation. We have shown that purified proteins interacted with AIDA-I by ELISA and that the apolipoprotein A-I colocalized with bacteria adhered to epithelial cells.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. The *Escherichia coli* K12 strain C600 (*thr-1*, *leuB6*, *thi-1*, *lacY1*, *supE44*, *rfaD1*, *fhuA21*; obtained from New England Biolabs) was used in this study. Plasmid pTRC99a vector (Pharmacia Biotech) was used in bacteria as a negative control. Plasmid pAg containing the whole *aidA* operon (*aah* and *aidA*) under the control of *ptrc*, a promoter inducible with isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), has been described before (21). pAg allows the expression of glycosylated AIDA-I. Plasmid pAgH, also previously described (21), is derived from pAg and allows expression of glycosylated AIDA-I tagged at the N terminus of the proprotein with six histidine amino acids and a glycine (HisG). Plasmid pAngH, allowing the expression of the HisG-tagged AIDA-I, was obtained by introducing an oligonucleotide coding for the HisG tag in the pAng plasmid by site-directed mutagenesis using mutagenic primers, as described previously for pAg (21). The plasmid pACYC-*gfp* was constructed as follow. The *ptrc* promoter region was extracted from the pTRC99a vector (Pharmacia Biotech) using *PvuII* and *BamHI* and then cloned upstream of the promoterless *gfp* gene in the pFPV25 vector (175) in

*Sma*I and *Bam*HI restriction sites. The resulting vector was then digested with *Ssp*I and *Hind*III and the fragment (containing the *ptrc* promoter and the *gfp* gene) was cloned into the pACYC184 plasmid (Pharmacia Biotech) in the *Hinc*II and *Hind*III restriction sites. The resulting plasmid is pACUC-*gfp*.

Surface Plasmon Resonance (SPR) analysis of AIDA-I/serum interaction.

Porcine serum (Invitrogen) was filtrated on a membrane of 0.22 μ m to remove potential contaminants, such as bacteria. Boiled porcine serum was obtained by incubating porcine serum in boiling water during 10 minutes. The sample was homogenised and centrifugated at 16000Xg during 10 minutes. The supernatant was recovered and filtrated on the same membrane as used for porcine serum. Boiled or porcine serum (1:500) was injected on the surface of a chip coupled with AIDA-I. SPR measurements were carried out using a Biacore 3000 system. AIDA-I was immobilized on a CM4 sensor chip using amine coupling conditions and experiments were optimized with HBL-P running buffer using a low flow rate (10 μ L/min) and 'QUICKINJECT' mode (3 – 5 min association). The serum pre-treatments were boiling for 10 min at 100°C or separation according to molecular weight (Millipore microcons YM10, YM30, YM100). Experiments were performed two times and the data represented are typical binding curves.

Adhesion assay. The adhesion assay was adapted from the assay performed by Benz and Schmidt, 1989 (12). Briefly, Hep-2 cells were grown to confluence in DMEM without antibiotic. The *E. coli* strains C600 harboring pACUC-*gfp* in combinaison with either the empty vector pTRC99a or pAg were grown overnight at 30°C in LB medium containing chloramphenicol and ampicillin. The cells were incubated with 10^7 bacteria in culture media at 37°C for 3 hours. After extensive washing with PBS-CM, cells were fixed in PFA 4% for 10 minutes and then sealed in gelvatol.

ELISA assay testing the interaction between AIDA-I and porcine serum or extracellular matrix proteins. We investigated by competitive ELISA the possibility of an interaction between AIDA-I proteins and purified common

molecules of the extracellular matrix, namely type III / IV / V collagen, type II and III porcine mucin and human and bovine fibronectine. We also investigated by ELISA the possibility of an interaction between purified AIDA-I proteins and porcine serum. Porcine serum or extracellular matrix proteins were bound on 96-flat bottom wells plates for 2 hours at 37°C followed by blocking of non-reacting site with a solution of PBS-casein 0,3% for 2 hours at 37°C. For wells with competitor, 85 µl/well of competitor was incubated for an hour prior to addition of AIDA-I. Solutions of AIDA-I in PBS-casein 0.3% - tween-20 0.05% were added at a final concentration of 150 nM and incubated for an hour at 37°C. Rabbit anti-AIDA-I serum 1:15000 (kindly provided by Dr M. Ngeleka, University of Saskatchewan) and anti-rabbit coupled to HRP 1:5 000 (Sigma) were pre-treated to eliminate the antibodies reacting with the porcine serum. The antibody solution was used to detect the presence of AIDA-I. A total of 100 µl of TMB was added to each well for 20 minutes and the reaction was stopped by addition of 100 µl of 1% sulphuric acid. Plates were read at 450 nm. The concentrations of tested extracellular matrix proteins are as followed: type III and V collagen (Sigma): 50 µg/well; type IV collagen (BD Bioscience): 2.5 µg/well; type II and III mucin (Sigma): 4 mg/well; fibronectin (Sigma): 50 µg/well. To pursue the characterization of the interacting molecules, we boiled porcine serum for 10 minutes and used the supernatant and assayed the sample for resulting binding.

The interaction between AIDA-I and apolipoprotein A-I was performed by ELISA using purified human apolipoprotein A-I (Sigma). Apolipoprotein A-I at a concentration of 50 µg/well was fixed on an ELISA microtiter plate. The interaction between AIDA-I and apolipoprotein A-I was investigated in the presence and absence of competitors (apolipoprotein A-I and boiled serum). The AIDA-I adhesin might be able to interact with other apolipoproteins, especially the apolipoprotein C-III which was isolated in combination with apolipoprotein A-I by porcine serum fractionation. Other purified apolipoproteins, namely B, C-I, C-II, C-III and E2 (Sigma) were also tested for their interaction with AIDA-I.

Affinity chromatography. AIDA-I proteins were coupled to UltraLink Biosupport beads (PIERCE). The coupling followed the general coupling instructions provided by manufacturer. Briefly, a solution of AIDA-I was added to the beads and allowed coupling at room temperature for 2 hours. Following centrifugation and removal of supernatant, a quench solution consisting of 3M ethanolamine hydrochloride (pH9) was added for 2.5 hours. Subsequently, beads were centrifuged, washed in PBS and resuspended in a solution of NaCl (1M) to remove nonspecifically attached proteins. Following extensive wash, beads were placed in a column. Porcine serum was applied to a column containing bound AIDA-I (AIDA column) and to a negative control column without bound AIDA-I (empty column). The flow was dictated by gravity. Following flow-thru of the serum, extensive wash with PBS was performed and elution was carried out with PBS- NaCl (1M) – Triton X-100 (1%). Fractions of 1 ml were collected and assayed for their potential interaction with AIDA-I by ELISA.

Ion exchange chromatography. To isolate the interacting molecule(s), boiled porcine serum was fractionated by ion exchange chromatography. Filtered (0.22 μ m) boiled porcine serum was loaded on a Mono Q 10/100 GL (GE Healthcare). The mobile phase consisted of Tris-HCL 20 mM (pH8) and the elution buffer was Tris-HCl (20 mM) + NaCl (1M); flow rate was 2 ml/min. A first elution step at 15% elution buffer was proceeded to eliminate proteins that are weakly binding to the column. Following the first elution step, a gradient ranging from 15-30% elution buffer was applied to the column. Fractions of 3 ml were collected and assayed for their potential interaction with AIDA-I by ELISA.

Gel filtration. The fraction from ion exchange chromatography that presented the higher interaction was then submitted to gel filtration to separate serum components. Fraction #28 from ion exchange chromatography was concentrated on Amicon Ultra 3K (Millipore) from 3 ml to 1 ml. Concentrated fraction #28 was loaded on a Superdex 75 xk16 column (GE Healthcare). The mobile phase consisted of Tris-HCL 20 mM (pH8). The flow rate for the gel filtration column was 0.7 ml/min and

fractions of 3 ml were collected. Resulting fractions were assayed for their interaction potential with AIDA-I and then separated by gel electrophoresis.

Mass spectrometry. Fractions were concentrated on Amicon Ultra 30K and run on PAGEr® Gold Precast Gel 4-20% Tris-Glycine gel (LONZA). The bands were cut from gel and destained with water-sodium bicarbonate buffer and acetonitrile. The proteins were reduced with dithiothreitol and alkylated with iodoacetamide prior to in-gel digestion with trypsin or chymotrypsin. The tryptic peptides were eluted from the gel with acetonitrile containing 0.1% trifluoroacetic acid. The tryptic peptides were then separated on an Agilent Nanopump system using a C18 ZORBAX trap and a SB-C18 ZORBAX 300 reversed-phase column (Agilent Technologies, Inc.) (150 mm by 75 μ m; 3.5 μ m particle size). All mass spectra were recorded on a hybrid linear ion trap-triple quadrupole mass spectrometer (Q-Trap; AB Applied Biosystems) equipped with a nanoelectrospray ionization source. The accumulation of MS-MS data was performed with Analyst software, version 1.4 (AB Applied Biosystems). MASCOT software (Matrix Science, London, United Kingdom) was used to create peak lists from MS and MS-MS raw data.

Removal of bacterial lipopolysaccharides (LPS) in the AIDA-I solution.

Apolipoprotein A-I has been reported to bind to LPS (102, 108, 125). The solution of purified AIDA-I contains a great amount of LPS. To determine whether the interaction between the apolipoprotein A-I and AIDA-I is the result of a molecular bridge mediated by the LPS, bacterial LPS was removed from the AIDA-I solution. Solution of purified AIDA-I was loaded on a Detoxi-Gel™ Endotoxin Removing Gel (ThermoScientific). The removal of the LPS was performed as indicated by the supplier. Quantification of LPS content was performed with *Limulus* Amebocyte Lysate PYROCHROME® (Associates of CAPE COD Incorporated). The final LPS concentration in AIDA-I solution is 0.1 ng/ml.

Colocalization assay. Following the adhesion assay of *E. coli* strains C600 pACUC-*gfp* with either the empty vector pTRC99a or pAg on Hep-2 cells, the microscope

cover glass were blocked with PBS-CM containing 0.2% BSA. Anti-apolipoprotein A-I (Santa Cruz Biotechnology; apoA-I (5F4F5):sc-101438) at a concentration of 1:500 and anti-mouse coupled to Alexa Fluor 568 (Molecular probe) at a concentration of 1:500 were pre-incubated together to prevent subsequent extensive wash and possible elimination of attached bacteria. The antibody solution was used to detect the presence of apolipoprotein A-I. Following incubation with the antibody solution, cells were washed in PBS-CM and sealed in gelvatol.

Confocal microscopy. Microscopy was performed on a confocal microscope at 60X in Kalman mode. Excitation of GFP was performed with a 488 nm laser and excitation of Alexa Fluor 568 was performed with a 543 nm laser. Emission was observed at 515/15 for GFP and at 605/50 for Alexa Fluor 568.

RESULTS

AIDA-I does not bind to purified extracellular matrix molecules. The level of interaction with AIDA-I for all tested purified extracellular matrix molecules was not different than the one observed for the negative control (Figure 1).

AIDA-I binds to porcine serum molecules. The results of the ELISA assay on porcine serum shown in figure 2 reveal an interaction between adhered porcine serum molecules and AIDA-I. The molecules interacting with AIDA-I is heat-resistant and seems to be enriched in the supernatant of boiled porcine serum. We then treated the porcine serum by ultrafiltration with cut off of 30 kDa and 100 kDa. The analyses of the results indicate that the molecule interacting with AIDA-I have a molecular weight between 30 kDa and 100 kDa (data not shown).

Isolation of molecule(s) interacting with AIDA-I.

Ion exchange chromatography and gel filtration. Obtained fractions were tested by ELISA for their interacting potential with AIDA-I. Three bands were obtained (Figure 3) and analysed by fingerprint mass spectrometry. Two bands corresponded

to the pig apolipoprotein A-I (bands A and B) and the third band consisted of pig apolipoprotein C-III (band C).

Affinity chromatography. The eluted fraction from both columns was separated by SDS-PAGE and compared. Three bands present in the AIDA column fraction were absent in the empty column fraction were analyzed by mass spectrometry (Figure 4). The band A corresponded to IgM antibodies while the band C corresponded to a trypsin precursor. The presence of antibodies and trypsin in high concentration into porcine serum and the use of trypsin in the mass spectrometry analysis ruled out the significance of these results. The band B corresponded to the pig apolipoprotein A-I precursor.

Interaction between apolipoprotein A-I and AIDA-I. The isolation of apolipoprotein A-I from porcine serum by various means indicate the existence of a possible interaction between that protein and AIDA-I. An interaction was observed between AIDA-I and purified apolipoprotein A-I (Figure 5). That interaction was greatly diminished by the addition of competitors (boiled porcine serum or purified solution of apolipoprotein A-I (0.5 mg/ml)).

A second ELISA assay on fixed apolipoprotein A-I was performed and as showed in figure 6 the interaction between the apolipoprotein A-I and AIDA-I still occurs in very-limited amount of LPS.

Purified AIDA-I interacts with apolipoprotein A-I and apolipoprotein B but not with other apolipoproteins. Interaction of the apolipoprotein with purified AIDA-I adhesin was observed for apolipoprotein A-I and B but not for any other apolipoproteins (Figure 7).

Colocalization of bacteria expressing AIDA-I and the apolipoprotein A-I. Figure 8 shows a significant colocalization between the apolipoprotein A-I and GFP-fluorescent bacteria expressing AIDA-I (AIDA-I +). Residual adhered GFP-

fluorescent bacteria without AIDA-I (AIDA-I⁻) do not colocalize specifically with the apolipoprotein A-I.

DISCUSSION

Identification of receptor for a specific adhesin is a crucial step into the comprehension of pathogenicity and in the elaboration of a potential therapy. Previous studies have been conducted to identify the receptor for the AIDA-I adhesin. Published reports by Laarmann and Schmidt (2003) and Fang *et al.* (2008) have isolated different receptors from, respectively, cultured epithelial cell and porcine intestinal mucus. A glycoprotein of 119 kDa was isolated from epithelial cell membrane and experiences conducted on intestinal mucus isolated two proteins: a nuclear or cytoplasmic protein of 120 kDa and a protein of unknown nature of 65 kDa (45, 90). However, these two studies did not characterized the interaction between AIDA-I and the purified potential receptor molecule. Furthermore these studies haven't carefully investigated the importance of the receptor/AIDA-I interaction during adhesion, invasion, autoaggregation or biofilm formation processes. The invasion process mediated by the AT AIDA-I haven't been fully characterized. Our laboratory has investigated the potential of the AIDA-I AT to mediate invasion. The results are presented in annex 1. Previous works have demonstrated that a variety of pathogens expressing AT can use extracellular matrix proteins in order to adhere to epithelial cells. The AIDA-I protein was present in several *E. coli* isolated from pigs with PWD or ED and as an AT. Thus AIDA-I might be able to bind to molecules contained in porcine serum (62). Our laboratory investigated if the AT AIDA-I utilized serum molecules as potential receptor. Serum proteins can be used as a direct receptor for the adhesin or as a molecular bridge to adhere to targeted cells. The apolipoprotein A-I was isolated by means of affinity chromatography and serum fractionation. The interaction between the potential receptor and the AIDA-I AT was confirmed by an ELISA assay performed with purified human apolipoprotein A-I and by means of an colocalization assay during the adhesion process of bacteria expressing AIDA-I adhered to cultured epithelial cells. Apolipoproteins are blood proteins with various known properties. They are

found in lipoproteins vesicles of various size and density and many of them are present in combination with other apolipoproteins.

The apolipoprotein A-I is common to many species including man kind. This apolipoprotein is present in the blood and the small intestine. It is synthesised in both the liver and the small intestine as a preproapolipoprotein of 267 amino acids. The N-terminal domain of the preproapolipoprotein contains a signal sequence and the cleavage of 18 amino acids form the proapolipoprotein which will be further processed in the mature apolipoprotein A-I of 28.3 kDa by a protease (98, 162).

The possibility of an interaction between AIDA-I and the apolipoprotein A-I can only be feasible in the intestinal lumen, where *E. coli* expressing AIDA-I can mediate infection. The secretion of the apolipoprotein A-I into the lumen of the intestine is essential for an interaction between these two proteins. It has been reported that piglet cultured small intestinal segments were able to secrete apolipoprotein A-I from their apical surface (32, 180). What are the factors that regulate the secretion of the apolipoprotein A-I in the intestine? Dietary lipid absorption seems to up regulate the synthesis and secretion of the apolipoprotein A-I in the intestinal lumen. However, during the fasting of piglets, 90% of the intracellular apolipoprotein A-I is not associated with dietary lipids. The absence of implication of the apolipoprotein A-I in the transport and/or absorption of dietary fats raises an important question: what is the role of the apolipoprotein A-I in the intestinal lumen? Unfortunately, no studies were performed to elucidate this question and little is known on the presence and role of intestinal apically secreted apolipoprotein A-I.

It is surprising to notice the presence of the apolipoprotein A-I in the final fraction obtained after porcine serum fractionation since its molecular weight (28.3 kDa) is smaller than the filter used to concentrate the fraction (30 kDa filter). Logically, the vast majority of the apolipoprotein A-I should have been found in the filtrate. However, in regard to the origin of the sample, it is consistent that the apolipoprotein A-I wouldn't be discarded in the filtrate after concentration of the

sample since serum apolipoprotein A-I is found in High Density Lipoprotein (HDL) vesicles in association with other apolipoproteins, phospholipids and cholesterol. HDL molecules are 6 to 12.5 nm in diameter so they locate in the supernatant of the concentrated fraction. A surprising data is that the apolipoprotein C-III isolated by serum fractionation doesn't interact with AIDA-I by ELISA. Since, the apolipoprotein C-III is found in HDL together with apolipoprotein A-I it is most likely that its presence in the interacting fraction resulted from its common location in the HDL vesicle.

Many interactions between pathogens and apolipoproteins have been described and these interactions can either be useful for the pathogen or for the host. Bacteria might use the interaction with an apolipoprotein to improve its pathogenesis as with the serum opacity factor (SOF) of group A *Streptococcus*. The SOF interacts with apolipoproteins A-I and A-II contained in HDL vesicles, disrupt their structure which might diminish their anti-inflammatory action contributing at the establishment of pathogenesis (26, 61, 67, 140). An other example consists of hepatitis C virus interaction with the apolipoprotein E. It has been established that infectious virions specifically interact with the apolipoprotein E thus improving their ability to infect and produce virus in host cells (10, 19, 76, 87).

The interaction of an apolipoprotein with bacteria can also be useful for the host. During *Staphylococcus aureus* infection, the apolipoproteins B confers an important protection role for the host. The apolipoprotein B contained in LDL and VLDL interferes with the quorum sensing *agr* system thus blocking the activation of the invasive genes of *S. aureus* (115, 131). Finally, it is interesting to mention that reports established that the apolipoprotein A-I has an inhibitory effect *in vitro* on *E. coli* growth (186).

CONCLUSION

The AT AIDA-I interacts with the host-protein apolipoprotein A-I. Further characterization of the interaction by the identification of the AIDA-I residues

interacting with the apolipoprotein A-I will be necessary. Future works will also focus on the purpose of this interaction i.e. whether useful for the bacteria during the infection process or if the interaction is the result of the host immune system response. As an example, an adhesion assay comprising the efficacy of the adhesion of bacteria expressing AIDA-I pre-incubated or not with apolipoprotein A-I could be performed.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by financial contributions from the Groupe de Recherche et d'Etudes sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC discovery grant 262746) and the Canada Research Chair program.

REFERENCES

1. **Benga, W. J., S. E. Krieger, M. Dimitrova, M. B. Zeisel, M. Parnot, J. Lupberger, E. Hildt, G. Luo, J. McLauchlan, T. F. Baumert, and C. Schuster.** Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**:43-53.
2. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:1506-11.
3. **Chang, K. S., J. Jiang, Z. Cai, and G. Luo.** 2007. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* **81**:13783-93.
4. **Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez.** 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**:8504-12.
5. **Courtney, H. S., Y. M. Zhang, M. W. Frank, and C. O. Rock.** 2006. Serum opacity factor, a streptococcal virulence factor that binds to apolipoproteins A-I and A-II and disrupts high density lipoprotein structure. *J Biol Chem* **281**:5515-21.
6. **Danielsen, E. M., G. H. Hansen, and M. D. Poulsen.** 1993. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol* **120**:1347-56.
7. **DebRoy, C., E. Roberts, W. Scheuchenzuber, S. Kariyawasam, and B. M. Jayarao.** 2009. Comparison of genotypes of *Escherichia coli* strains carrying F18ab and F18ac fimbriae from pigs. *J Vet Diagn Invest* **21**:359-64.
8. **Dorsey, C. W., M. C. Laarakker, A. D. Humphries, E. H. Weening, and A. J. Baumler.** 2005. *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**:196-211.

9. **Fang, Y., M. Ngeleka, D. M. Middleton, and E. Simko.** 2008. Isolation and identification of AIDA-I receptors in porcine intestinal mucus. *Vet Microbiol* **126**:345-55.
10. **Fink, D. L., B. A. Green, and J. W. St Geme, 3rd.** 2002. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect Immun* **70**:4902-7.
11. **Frydendahl, K.** 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* **85**:169-82.
12. **Gillen, C. M., H. S. Courtney, K. Schulze, M. Rohde, M. R. Wilson, A. M. Timmer, C. A. Guzman, V. Nizet, G. S. Chhatwal, and M. J. Walker.** 2008. Opacity factor activity and epithelial cell binding by the serum opacity factor protein of *Streptococcus pyogenes* are functionally discrete. *J Biol Chem* **283**:6359-66.
13. **Girard, V., and M. Mourez.** 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Res Microbiol* **157**:407-16.
14. **Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae.** 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-81.
15. **Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-8.
16. **Han, M., B. K. Gillard, H. S. Courtney, K. Ward, C. Rosales, H. Khant, S. J. Ludtke, and H. J. Pownall.** 2009. Disruption of human plasma high-density lipoproteins by streptococcal serum opacity factor requires labile apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **48**:1481-7.
17. **Han, W., B. Liu, B. Cao, L. Beutin, U. Kruger, H. Liu, Y. Li, Y. Liu, L. Feng, and L. Wang.** 2007. DNA microarray-based identification of serogroups and virulence gene patterns of *Escherichia coli* isolates associated

- with porcine postweaning diarrhea and edema disease. *Appl Environ Microbiol* **73**:4082-8.
18. **Heise, T., and P. Dersch.** 2006. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3375-80.
 19. **Helgerson, A. F., V. Sharma, A. M. Dow, R. Schroeder, K. Post, and N. A. Cornick.** 2006. Edema disease caused by a clone of *Escherichia coli* O147. *J Clin Microbiol* **44**:3074-7.
 20. **Icard, V., O. Diaz, C. Scholtes, L. Perrin-Cocon, C. Ramiere, R. Bartenschlager, F. Penin, V. Lotteau, and P. Andre.** 2009. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One* **4**:e4233.
 21. **Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, C. Rich, and B. Joly.** 1994. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol* **145**:621-32.
 22. **Kingsley, R. A., D. Abi Ghanem, N. Puebla-Osorio, A. M. Keestra, L. Berghman, and A. J. Baumler.** 2004. Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol* **186**:4931-9.
 23. **Klemm, P., R. M. Vejborg, and O. Sherlock.** 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* **296**:187-95.
 24. **Kostakioti, M., and C. Stathopoulos.** 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **72**:5548-54.
 25. **Kuhlmann, I., A. M. Minihane, P. Huebbe, A. Nebel, and G. Rimbach.** Apolipoprotein E genotype and hepatitis C, HIV and herpes simplex disease risk: a literature review. *Lipids Health Dis* **9**:8.
 26. **Laarmann, S., and M. A. Schmidt.** 2003. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**:1871-82.

27. **Levy, E., and M. Bendayan.** 2000. Use of immunoelectron microscopy and intestinal models to explore the elaboration of apolipoproteins required for intraenterocyte lipid transport. *Microsc Res Tech* **49**:374-82.
28. **Ma, J., X. L. Liao, B. Lou, and M. P. Wu.** 2004. Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **36**:419-24.
29. **McDonald, M. C., P. Dhadly, G. W. Cockerill, S. Cuzzocrea, H. Mota-Filipe, C. J. Hinds, N. E. Miller, and C. Thiemermann.** 2003. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* **20**:551-7.
30. **Mintz, K. P.** 2004. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Microbiology* **150**:2677-88.
31. **Nabuurs, M. J., E. J. Van De Weijert, A. F. Grootendorst, and T. A. Niewold.** 2001. Oedema disease is associated with metabolic acidosis and small intestinal acidosis. *Res Vet Sci* **70**:247-53.
32. **Netea, M. G., L. A. Joosten, M. Keuter, F. Wagener, A. F. Stalenhoef, J. W. van der Meer, and B. J. Kullberg.** 2009. Circulating lipoproteins are a crucial component of host defense against invasive *Salmonella typhimurium* infection. *PLoS One* **4**:e4237.
33. **Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
34. **Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
35. **Pajkrt, D., J. E. Doran, F. Koster, P. G. Lerch, B. Arnet, T. van der Poll, J. W. ten Cate, and S. J. van Deventer.** 1996. Antiinflammatory effects of

- reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med* **184**:1601-8.
36. **Peterson, M. M., J. L. Mack, P. R. Hall, A. A. Alsup, S. M. Alexander, E. K. Sully, Y. S. Sawires, A. L. Cheung, M. Otto, and H. D. Gresham.** 2008. Apolipoprotein B Is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe* **4**:555-66.
 37. **Ravi, M., M. Ngeleka, S. H. Kim, C. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. Middleton, and E. Simko.** 2007. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**:308-19.
 38. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Walzlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**:1267-78.
 39. **Rosales, C., B. K. Gillard, H. S. Courtney, F. Blanco-Vaca, and H. J. Pownall.** 2009. Apolipoprotein modulation of streptococcal serum opacity factor activity against human plasma high-density lipoproteins. *Biochemistry* **48**:8070-6.
 40. **Scaletsky, I. C., M. Z. Pedroso, M. B. Morais, R. L. Carvalho, R. M. Silva, S. H. Fabbricotti, and U. Fagundes-Neto.** 1999. [Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea]. *Arq Gastroenterol* **36**:54-60.
 41. **Scarselli, M., D. Serruto, P. Montanari, B. Capecchi, J. Adu-Bobie, D. Veggi, R. Rappuoli, M. Pizza, and B. Arico.** 2006. *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* **61**:631-44.
 42. **Stahl, C. H., T. R. Callaway, L. M. Lincoln, S. M. Lonergan, and K. J. Genovese.** 2004. Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3119-21.

43. **Stoffel, W.** 1984. Synthesis, transport, and processing of apolipoproteins of high density lipoproteins. *J Lipid Res* **25**:1586-92.
44. **Tsukahara, T., N. Nakanishi, K. Nakayama, N. Matsubara, and K. Ushida.** 2005. Experimental infection of enterotoxemic *Escherichia coli* associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. *J Vet Med Sci* **67**:1167-71.
45. **Valdivia, R. H., and S. Falkow.** 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol* **22**:367-78.
46. **Valle, J., A. N. Mabbett, G. C. Ulett, A. Toledo-Arana, K. Wecker, M. Totsika, M. A. Schembri, J. M. Ghigo, and C. Beloin.** 2008. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**:4147-61.
47. **Verdonck, F., P. Tiels, K. van Gog, B. M. Goddeeris, N. Lycke, J. Clements, and E. Cox.** 2007. Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ *Escherichia coli* infection. *Vet Immunol Immunopathol* **120**:69-79.
48. **Vreugdenhil, A. C., A. M. Snoek, J. W. Greve, and W. A. Buurman.** 2000. Lipopolysaccharide-binding protein is vectorially secreted and transported by cultured intestinal epithelial cells and is present in the intestinal mucus of mice. *J Immunol* **165**:4561-6.
49. **Zhang, P., B. B. Chomel, M. K. Schau, J. S. Goo, S. Droz, K. L. Kelminson, S. S. George, N. W. Lerche, and J. E. Koehler.** 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13630-5.
50. **Zhang, W., M. Zhao, L. Ruesch, A. Omot, and D. Francis.** 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**:145-52.
51. **Zhang, Z., G. Datta, Y. Zhang, A. P. Miller, P. Mochon, Y. F. Chen, J. Chatham, G. M. Anantharamaiah, and C. R. White.** 2009. Apolipoprotein

A-I mimetic peptide treatment inhibits inflammatory responses and improves survival in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**:H866-73.

52. **Zhao, L., X. Chen, X. Xu, G. Song, and X. Liu.** 2009. Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *Vet J* **180**:124-9.

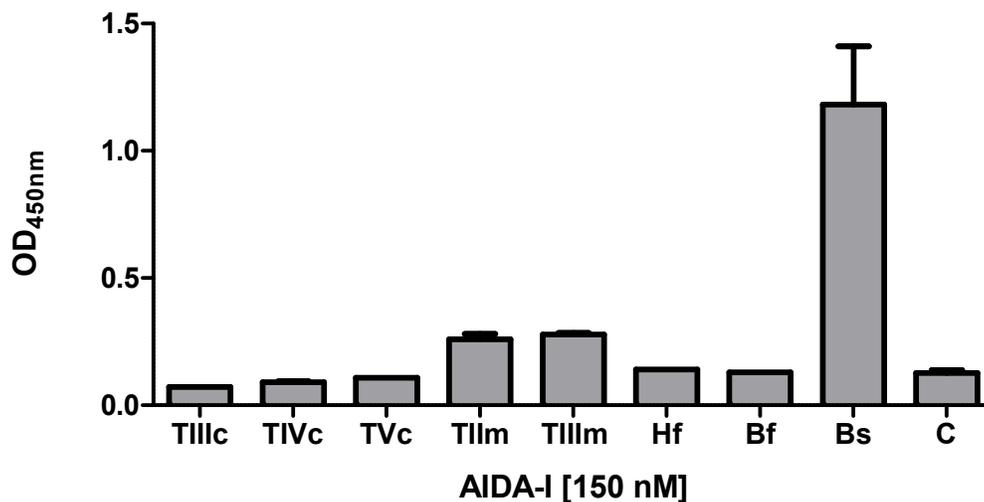


Figure 1. : Interaction between purified AIDA-I and extracellular matrix proteins. Tested compounds were bound on 96-flat bottom wells plates and interaction between fixed proteins with a solution of AIDA-I (150 nM) was assayed by ELISA. Boiled porcine serum (Bs) is use as a positive control and casein blocked wells as a negative control (C). The results represent the interaction between AIDA-I and extracellular matrix proteins or boiled porcine serum. Tested extracellular matrix proteins: Type III collagen (TIIIc); Type IV collagen (TIVc); Type V collagen (TVc); Type II mucin (TIIIm); type III mucin (TIIIm); Human fibronectine (Hf) and Bovine fibronectine (Bf).

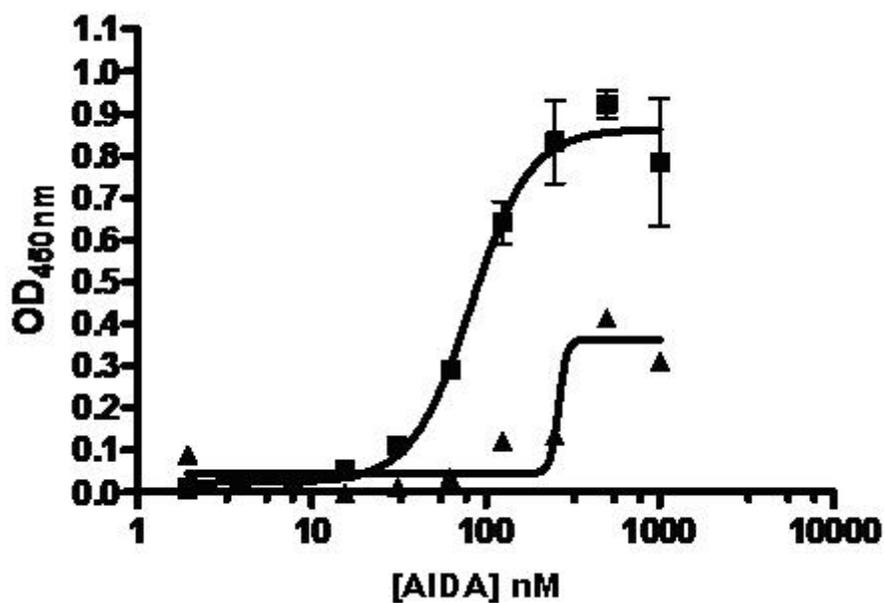


Figure 2. : Interaction between AIDA-I and porcine serum.

Porcine serum was bound on 96-flat bottom wells plates and interaction with solutions of AIDA-I ranging from 1 nM to 1 M was assayed by ELISA. Casein blocked wells were use as a negative control. The results show AIDA-I binding to components of porcine serum (squares) and a control showing the binding of AIDA-I to casein (triangle).

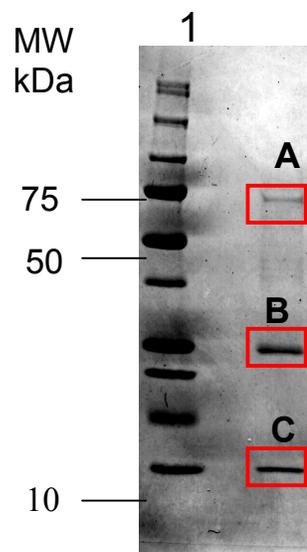


Figure 3. Bands obtained after serum fractionation on ion exchange chromatography followed by gel filtration.

Fractions obtained by fractionation of the porcine serum on an ion exchange chromatography (mono Q) followed by gel filtration (Superdex) were tested for their interaction with purified AIDA-I by ELISA. The fraction presenting the highest interaction with AIDA-I was concentrated on Amicon Ultra 30K and run on PAGER® Gold Precast Gel 4-20% Tris-Glycine gel (LONZA). Three bands (A; B; C) were obtained and analysed by mass spectrometry. The concentrated fraction is indicated by F.

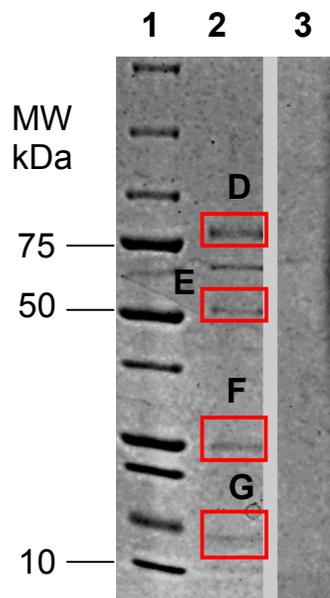


Figure 4. Bands obtained after affinity chromatography on porcine serum with the AIDA column and the empty column.

Fractions obtained by affinity chromatography on the porcine serum on AIDA column (column 2) and on the empty column (column 3) were run on PAGEr® Gold Precast Gel 4-20% Tris-Glycine gel (LONZA). Four bands (D; E; F;G) were obtained differentially in the AIDA column by comparison with the empty column and analysed by mass spectrometry.

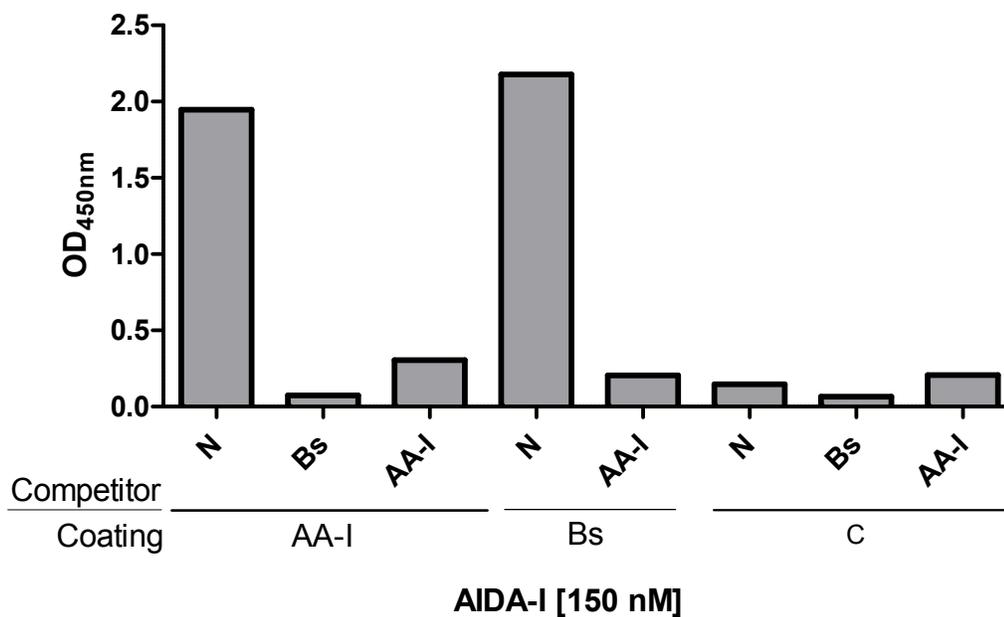


Figure 5. : Interaction between purified apolipoprotein A-I and AIDA-I.

Apolipoprotein A-I (AA-I) was bind on 96-flat bottom wells plates and interaction between fixed apolipoprotein A-I and a solution of 150 nM of AIDA-I was assayed by ELISA. Competition assay with AA-I, boiled serum (Bs) or no competitor (N) was also performed. Bs is use as a positive interaction and casein blocked wells as a negative control (C). The results represent the interaction between AIDA-I and apolipoprotein A-I and boiled porcine serum.

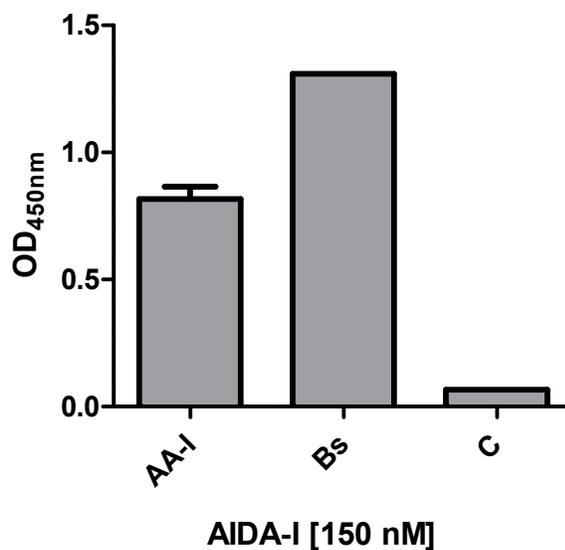


Figure 6. : Interaction between apolipoprotein A-I and AIDA-I.

Apolipoprotein A-I (AA-I) was bound on a 96-flat bottom well plates and interaction between fixed apolipoprotein A-I and a solution of 150 nM of AIDA-I free of LPS was assayed by ELISA. Boiled porcine serum (Bs) is used as a positive control and casein blocked wells as a negative control (C). The results show the interaction between AIDA-I and apolipoprotein A-I and boiled porcine serum.

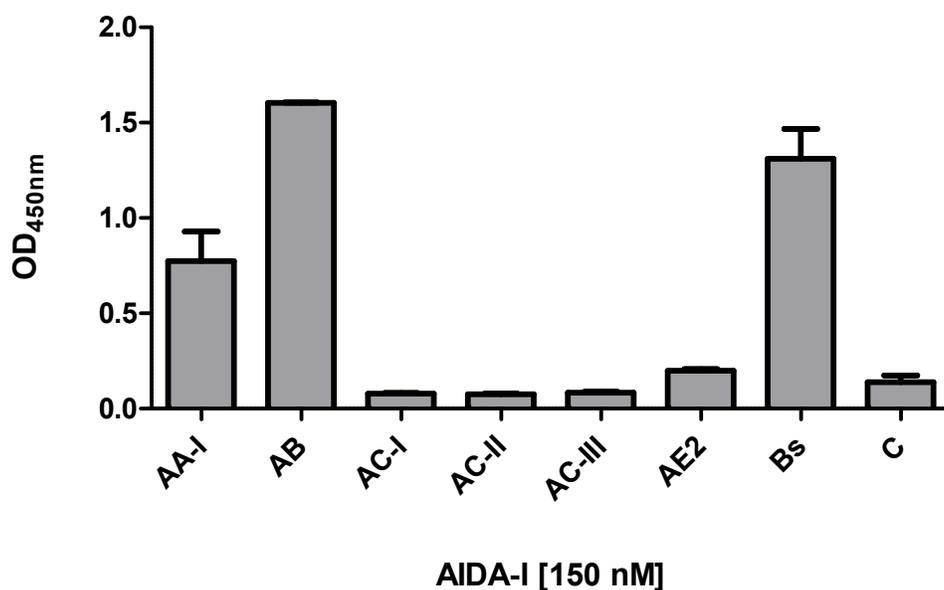


Figure 7. : Interaction between purified apolipoproteins and AIDA-I.

Apolipoproteins were bound on 96-flat bottom well plates and interaction between fixed apolipoproteins and a solution of 150 nM of AIDA-I was assayed by ELISA. Bs is used as a positive control and casein blocked wells as a negative control (C). The results show the interaction between AIDA-I and apolipoprotein A-I and boiled porcine serum. Tested apolipoproteins are: Apolipoprotein A-I (AA-I); Apolipoprotein B (AB); Apolipoprotein CI (AC-I); Apolipoprotein C-II (AC-II); Apolipoprotein C-III (AC-III) et Apolipoprotein E2 (AE2).

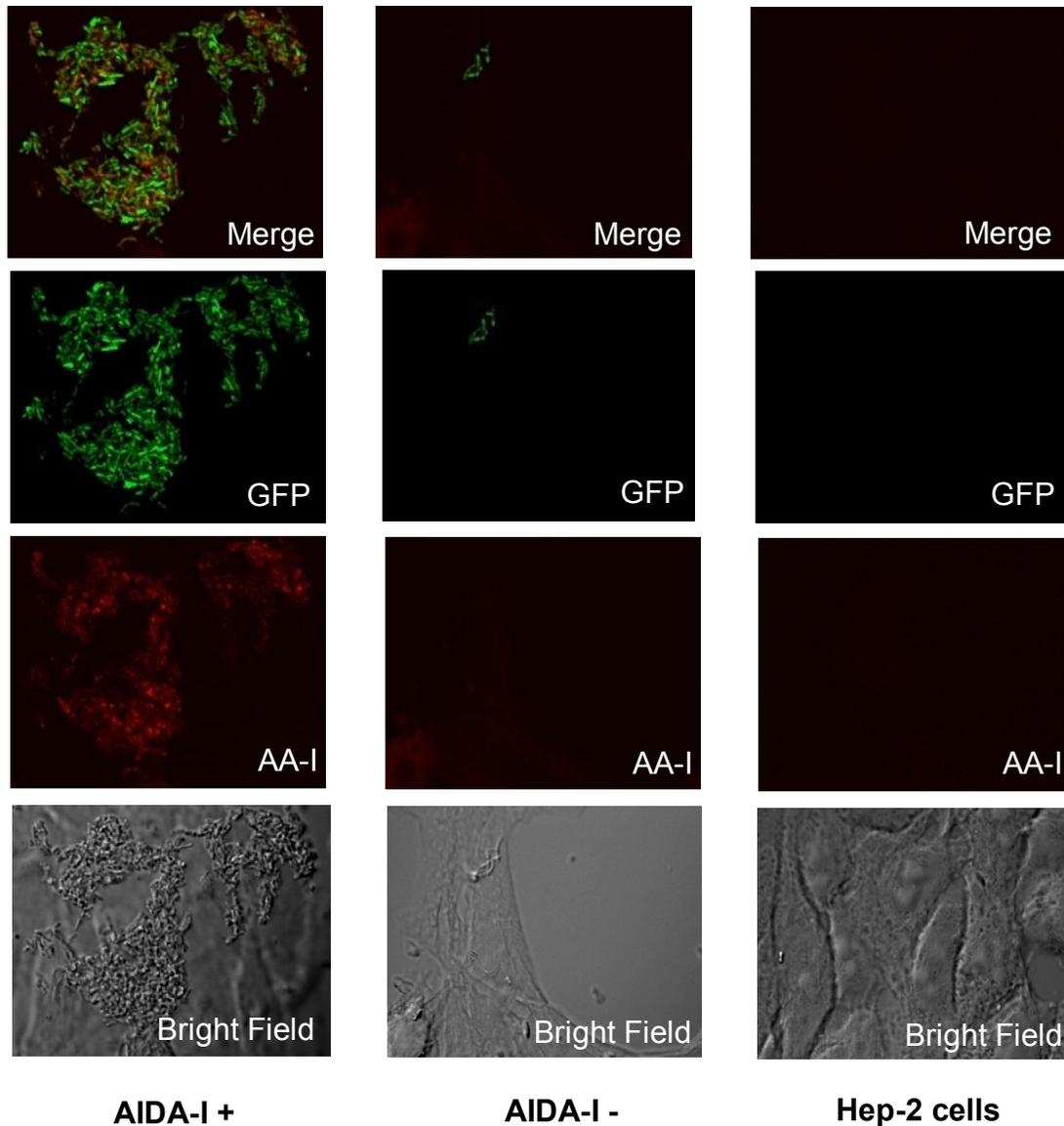


Figure 8. : Colocalization of bacteria expressing AIDA-I and the apolipoprotein A-I on Hep-2 cultured epithelial cell using confocal microscopy.

Adhesion of *E. coli* strains expressing the green fluorescent protein (GFP) with AIDA-I (AIDA +) or without AIDA-I (AIDA-I -) on Hep-2 cultured cell line. Detection of the apolipoprotein A-I (AA-I) was performed with antibodies against apolipoprotein A-I and α -mouse monoclonal secondary antibody coupled to Alexa Fluor 568. The antibody solution was used to detect the presence of apolipoprotein A-I.

DISCUSSION

Notre étude portant sur la recherche du récepteur de l'autotransporteur AIDA-I d'*E. coli* nous a permis d'éliminer l'hypothèse selon laquelle certaines molécules de la matrice extracellulaire telles que le collagène de type III, IV, V et la fibronectine servirait de récepteur à AIDA-I. La recherche de récepteurs effectuée à partir de la mucine gastrique de type II et III ainsi que dans des prélèvements de lumen intestinal porcine n'a également pas permis d'isoler et d'identifier un récepteur potentiel. Cependant, la recherche à partir du sérum porcine nous a permis d'isoler et d'identifier une protéine, l'apolipoprotéine A-I, en tant que récepteur potentiel. En effet, deux méthodes distinctes nous ont permis d'identifier l'apolipoprotéine A-I comme récepteur potentiel pour AIDA-I. L'apolipoprotéine A-I a été isolée du sérum porcine par chromatographie d'affinité utilisant une colonne formée de billes sur lesquelles AIDA-I était couplé de façon covalente et par le fractionnement du sérum via une chromatographie échangeuse d'ions suivie du fractionnement sur une colonne de filtration moléculaire. L'interaction spécifique entre AIDA-I et l'apolipoprotéine A-I humaine purifiée a été démontrée par ELISA. La présence de l'interaction a également été établie grâce à la microscopie en fluorescence par la visualisation de la présence d'apolipoprotéine A-I lors du phénotype d'adhésion d'*E. coli* exprimant AIDA-I sur cellules Hep-2 en culture. Cependant, l'analyse de l'interaction AIDA-I – apolipoprotéine A-I requiert l'acquisition préalable de notions de base sur les apolipoprotéines.

La MO et la DPS sont deux maladies principalement engendrées par la présence d'*E. coli* pathogènes dans le lumen intestinal des porcelets. Certaines souches d'*E. coli* isolées des porcelets affectés par ces deux maladies ont démontré la présence de l'adhésine AIDA-I. L'AT AIDA-I confère plusieurs fonctions aux bactéries l'exprimant dont la capacité d'invasion des cellules hôte. Cependant, la capacité d'invasion engendrée par AIDA-I est peu caractérisée et encore mal comprise. La recherche d'un récepteur pour AIDA-I nécessite une bonne compréhension de cette adhésine et de ces fonctions. Nous avons donc étudié la fonction d'invasion engendrée par AIDA-I (annexe 1). Notre étude de l'invasion *in vitro* d'*E. coli* exprimant AIDA-I nous a permis de

déduire que l'AT AIDA-I permet l'invasion des cellules épithéliales Hep-2 en culture. Cependant, l'unique présence d'AIDA-I ne permet pas la survie de la bactérie à l'intérieur de la cellule. Par contre, la cinétique d'invasion effectuée avec la souche sauvage 2787 a démontré que cette dernière possédait la capacité de survivre à l'intérieur des cellules-hôtes. Face à ces résultats, il est logique d'assumer que la souche sauvage possède un ou plusieurs facteurs de virulence lui permettant de survivre dans la cellule. Cependant, l'étude présente ne permet pas de discerner si la survie des bactéries 2787 observée est le résultat de la survie de la majorité ou d'une sous-population possédant la capacité de se multiplier à l'intérieur de la cellule. Afin d'éclaircir ce point, des expériences de microscopie électronique permettant de visualiser les bactéries à l'intérieur de la cellule pourraient être effectuées. Des marqueurs différentiels pour les bactéries vivantes/mortes pourraient également être utilisés lors de visualisation en microscopie de fluorescence. La microscopie possède également l'avantage de localiser les bactéries à l'intérieur de la cellule. Il serait également intéressant de comparer les génomes de la souche sauvage avec d'autres génomes de bactéries qui ont des capacités d'invasion, i.e. EIEC, Shigella, Listeria, etc., afin de déterminer si certains gènes codent pour des facteurs de virulence impliqués dans la survie intracellulaire sont présents chez la souche pathogénique *E. coli* 2787.

Notre étude sur la recherche d'un récepteur de l'adhésine AIDA-I a établi que cette dernière possédait la capacité d'interagir avec l'apolipoprotéine A-I, une protéine sanguine soluble. La possibilité d'une interaction entre AIDA-I et l'apolipoprotéine A-I ne peut avoir lieu que dans l'intestin, là où les *E. coli* exprimant AIDA-I sont présentes. Il est donc essentiel que l'apolipoprotéine A-I soit sécrétée dans le lumen intestinal ou présente à la surface des entérocytes afin qu'une telle interaction puisse avoir lieu. L'apolipoprotéine A-I est-elle sécrétée dans le lumen de l'intestin?

Il a été démontré que des segments de petit intestin prélevé chez des porcelets et mis en culture possèdent la capacité de sécréter l'apolipoprotéine A-I à partir de leur surface apicale. En effet, l'étude de Poulsen *et al.* (1993) a démontré la présence d'apolipoprotéine A-I dans le milieu de culture apical grâce à des expériences utilisant les techniques d'immunobuvardage et d'immunoprécipitation (32). Une autre étude

effectuée sur la lignée cellulaire intestinale Caco-2 a démontré par ELISA que cette lignée possédait la capacité de sécréter l'apolipoprotéine A-I dans le milieu de culture à partir de sa surface apicale (180). L'apolipoprotéine A-I est donc sécrétée dans le lumen de l'intestin. Afin de mieux comprendre le métabolisme dans lequel l'apolipoprotéine A-I est impliquée, il est intéressant d'étudier les facteurs régulant sa sécrétion. Quels sont donc les facteurs qui régulent la sécrétion de l'apolipoprotéine A-I? Il semble que l'absorption de lipides diététiques augmente considérablement la synthèse ainsi que la sécrétion de l'apolipoprotéine A-I. En effet, une étude a démontré que des segments d'intestin prélevés chez le porc 3 heures après l'ingestion de lipides diététiques produisaient l'apolipoprotéine A-I en grande quantité. L'étude de Poulsen *et al.* (1993) a également démontré par pulse-chase qu'environ 85% de l'apolipoprotéine A-I nouvellement synthétisée est sécrétée dans le lumen du petit intestin où elle est retrouvée non-associée à des lipides diététiques. Cette dernière observation est surprenante puisqu'il est connu que les apolipoprotéines sont impliquées dans le transport des lipides dans le sang (32, 180). L'augmentation de la sécrétion de l'apolipoprotéine A-I dans l'intestin lors de l'absorption de lipides diététiques aurait pu indiquer une implication de cette protéine dans le transport et/ou l'absorption des lipides diététiques, mais cela ne semble pas être le cas. L'absence de l'implication de l'apolipoprotéine A-I lors de ces phénomènes soulève une question importante : quel est alors le rôle de la sécrétion de l'apolipoprotéine A-I dans le lumen intestinal? Malheureusement, aucune étude complémentaire n'a été effectuée afin de déterminer le rôle joué par l'apolipoprotéine A-I à l'intérieur de l'intestin. De plus, les connaissances actuelles sur l'apolipoprotéine A-I ne permettent pas d'obtenir un consensus quand à la nature de son récepteur ce qui limite l'élaboration d'hypothèses en ce qui a trait à son rôle à l'intérieur de l'intestin. Contrairement à l'apolipoprotéine A-I dans le lumen intestinal, suite à l'absorption des lipides par les entérocytes, l'apolipoprotéine A-I intracellulaire colocalise avec la surface des chylomicrons retrouvés dans le Golgi et avec la membrane basolatérale. D'autres études ayant examinées la localisation de l'apolipoprotéine A-I à l'intérieur des cellules intestinales ont démontrés que l'apolipoprotéine A-I intestinale est présente dans le système de sécrétion intracellulaire et qu'elle se colocalise avec les microvillus, la membrane des vésicules lisses apicales et la région du *trans*-Golgi. La localisation de

l'apolipoprotéine A-I à l'intérieur des entérocytes correspond à son implication dans la formation des vésicules lipoprotéiques (32, 180). Cependant, le rôle de l'apolipoprotéine A-I lors de l'absorption des lipides diététiques n'est pas défini.

La présence d'apolipoprotéine A-I sécrétée dans le lumen intestinal rend plausible l'interaction apolipoprotéine A-I - AIDA-I. Il est donc intéressant de se pencher sur les avantages qui pourraient être retirés par une telle interaction. Il semble vraisemblable que la forte quantité d'apolipoprotéine A-I présente dans l'intestin lors de la prise du lait maternel et surtout immédiatement après le début du sevrage puisse être un facteur permettant aux *E. coli* exprimant AIDA-I en combinaison avec d'autres facteurs de virulence d'engager la pathogenèse. En effet, les porcelets affectés par la DPS et l'MO développent généralement la maladie lors des deux premières semaines suivant le sevrage. Tout au long de cette fenêtre de temps, la concentration de l'apolipoprotéine A-I à l'intérieur de l'intestin est élevée, augmentant de ce fait les possibilités d'interaction entre les deux protéines. De plus, l'apolipoprotéine A-I est sécrétée dans le lumen de l'intestin où elle demeure libre et non-associée aux lipides ce qui augmente le nombre de sites potentiels libres pour l'interaction avec AIDA-I.

Quelles sont les hypothèses envisageables qui permettraient d'expliquer et de comprendre le rôle de l'interaction entre ces deux protéines? Le recrutement de l'apolipoprotéine A-I par AIDA-I pourrait être un moyen utilisé par la bactérie afin de favoriser l'établissement du processus d'infection soit en lui permettant de dissimuler sa présence grâce au recouvrement de la bactérie par des protéines de l'hôte ou bien en améliorant la capacité d'adhésion, d'invasion, de formation du biofilm ou d'autoaggrégation de la bactérie. Des observations préalables ont décrit la capacité de divers pathogènes à utiliser des apolipoprotéines spécifiques afin d'améliorer leur pathogénicité.

Une bactérie peut utiliser certains de ses facteurs de virulence afin de favoriser sa pathogenèse; citons l'exemple du facteur d'opacification du sérum (serum opacity factor, SOF) des streptococoques du groupe A. Une étude a démontré, grâce à une expérience mesurant l'opacification d'échantillon de sérum contenant des vésicules HDL, LDL ou VLDL, que le SOF perturbe la structure des vésicules HDL. Une

opacification du sérum a été observée uniquement dans le sérum contenant des vésicules HDL. La diminution colossale du niveau d'opacification du sérum lors d'une expérience complémentaire effectuée avec un sérum de souris inactivées pour la production d'apolipoprotéine A-I (possédant donc un niveau très réduit de vésicules HDL) démontre que la réaction d'opacification du sérum est effectuée via l'interaction du SOF avec les vésicules HDL. Finalement l'interaction du SOF avec les apolipoprotéines a été démontrée par une expérience mesurant l'interaction entre des billes recouvertes avec l'une des deux apolipoprotéines majeures des HDL, l'apolipoprotéine A-I et A-II, et le SOF. Il a ainsi été démontré que le SOF possède la capacité d'interagir avec les apolipoprotéines A-I et A-II. L'interaction du SOF avec les apolipoprotéines des vésicules HDL perturbe la structure des HDL ce qui pourrait diminuer leur action anti-inflammatoire contribuant ainsi à l'établissement de la pathogenèse des streptocoques (26, 61, 67, 140).

D'autres études ont fait état de l'amélioration de la capacité d'un pathogène à créer une infection grâce à son interaction avec une apolipoprotéine. Par exemple, une étude effectuée sur le virus de l'hépatite C (VHC) a démontré que les virions infectieux possédaient la capacité de lier l'apolipoprotéine E et que cette liaison leur permettait d'augmenter leur aptitude à infecter les cellules-hôte et à y promouvoir la production de virus. Chez le VHC, un nombre important d'évidences démontrent que les virions infectieux sont contenus dans les particules LVP (lipo-viro-particules) de densité variable pouvant être séparées sur gradient de sucrose. Des études portant sur les LVP ont démontré par immunobuvardage et immunoprécipitation que les particules de faible densité contiennent des virions infectieux ainsi que l'apolipoprotéine E. Des études complémentaires ont illustré la capacité d'anticorps α -apolipoprotéine E à neutraliser l'infectivité des particules du virus de l'hépatite C. De plus, il a été établi que l'inactivation du gène de l'apolipoprotéine E supprime l'assemblage des virions du virus de l'hépatite C. Ces phénomènes suggèrent un rôle primordial de l'apolipoprotéine E dans le processus d'infection par les particules LPV. Une étude récente a établi, par double-hybride et co-immunoprécipitation, que l'apolipoprotéine E interagit avec la protéine NS5A (nonstructural protein 5A; NS5A) du virus de l'hépatite C favorisant la production et l'assemblage des virions. Il a été démontré que les virions du virus de

l'hépatite C et l'apolipoprotéine E se lient au récepteur des LDL (LDL-R). La variation du génotype de l'apolipoprotéine E entraîne des modifications dans la capacité à lier le LDL-R ainsi que des modifications dans le cours des infections à l'hépatite C. Il est donc logique de formuler une hypothèse selon laquelle l'apolipoprotéine E, ainsi que son génotype, aurait un effet direct sur la pathogénicité du virus de l'hépatite C (10, 19, 76, 87). Cependant, il est à noter que plus d'un récepteur peut être à l'origine de la capacité du virus de l'hépatite C à infecter les cellules. Il est donc difficile de s'assurer que seule la liaison de l'apolipoprotéine E au LDL-R est impliquée lors de l'infection au virus de l'hépatite C.

La capacité d'un pathogène à créer une infection est également largement influencée par les différents génotypes d'apolipoprotéines présents chez les divers hôtes d'une même espèce. En effet, citons l'exemple de la relation qui existe entre la présence d'une allèle de l'apolipoprotéine E, nommé epsilon4 (apolipoprotéine E4) et la pathogénèse de *Chlamydomytila pneumoniae*. Cette étude a décrit l'effet des variants du génotype de l'apolipoprotéine sur la capacité d'adhérence des corps élémentaires de *C. pneumoniae* sur des cellules du cerveau. Il a été établi que la présence de l'apolipoprotéine E4 permet d'améliorer significativement l'adhérence des corps élémentaires de cette bactérie aux cellules (59).

Dans certains cas, l'interaction de l'apolipoprotéine avec un pathogène est utilisée par l'organisme infecté comme un moyen de défense. *Staphylococcus aureus* est un pathogène possédant la capacité de coloniser et d'envahir l'organisme qu'il infecte. La régulation du passage de l'état d'adhésion et de colonisation à l'état d'invasion est effectuée par son système de quorum-sensing Agr. L'opéron *agr* est présent chez la majorité des isolats cliniques de *S. aureus*. Ce groupe de gènes code pour le système de quorum-sensing qui est régulé par les promoteurs P2 et P3 dont le premier code pour l'AIP (autoinducing cyclic thiolactone peptide) ainsi qu'un régulateur à deux composantes tandis que le deuxième génère, en réponse à l'AIP, le transcrit ARNIII qui constitue l'effecteur de l'opéron. Il a été démontré par résonance plasmonique de surface (surface plasmon resonance, SPR) que l'apolipoprotéine B contenue dans les vésicules LDL et VLDL possède la capacité de lier l'AIP. La liaison de l'AIP par l'apolipoprotéine B empêche la transcription de l'opéron *agr* empêchant de ce fait le

passage en mode d'invasion. En effet, il a été démontré par RT-PCR quantitatif que la présence de vésicules VLDL et LDL empêchait la signalisation du système agr. De plus, le traitement des vésicules VLDL ou de l'apolipoprotéine B par des anticorps α -apolipoprotéine B restaurait la capacité de l'AIP à se lier et à induire la production du transcrit ARNIII de l'opéron agr (115, 131).

Finalement, il est intéressant de mentionner les effets importants engendrés par l'action de l'apolipoprotéine A-I répertoriées par diverses études sur cette protéine. Notons tout d'abord qu'une étude effectuée par Khovidhunkit *et al* a démontré que l'incubation d'apolipoprotéine A-I purifiée d'origine humaine en présence d'*E. coli* diminue sa croissance *in vitro* (186). D'autres études ont démontrées que l'utilisation de peptides mimétiques de l'apolipoprotéine A-I pouvait améliorer la survie de rats subissant une septicémie ou un choc toxique puisque ces peptides auraient la capacité de promouvoir la formation de vésicules de type HDL. Il est connu que les vésicules HDL et l'apolipoprotéine A-I possèdent la capacité de lier le lipopolysaccharide ce qui permet de neutraliser l'activité toxique du lipopolysaccharide augmentant de ce fait même le taux de survie lors d'une septicémie (23, 186). De plus, depuis quelques années, une attention particulière a été portée à l'utilisation de l'apolipoprotéine A-I ainsi qu'aux peptides mimétiques de l'apolipoprotéine A-I en tant que molécule thérapeutique. En effet, plusieurs études passées et présentes ont évalué la capacité d'administrer ces protéines pour le traitement de diverses maladies (178). Par exemple, une étude effectuée en 2002 a démontré que l'administration orale d'un peptide synthétique mimant l'apolipoprotéine A-I permettait de réduire dramatiquement l'athérosclérose chez la souris via un mécanisme impliquant le transport inversé du cholestérol ainsi que le retrait des molécules requises pour l'oxydation des LDL. Il est connu que l'oxydation des LDL peut entraîner l'inflammation des artères et augmenter les risques d'athérosclérose (114). Il est donc avantageux de tenter de développer une thérapie utilisant les bienfaits de l'apolipoprotéine A-I afin de traiter certaines maladies d'origine bactérienne tout en permettant de gagner un bénéfice supplémentaire grâce aux nombreux bienfaits attribués à l'apolipoprotéine A-I. Actuellement, de nombreuses

recherches sont en cours afin de développer divers traitements utilisant l'apolipoprotéine A-I (69, 79, 102, 114, 124, 164, 178, 186).

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées afin d'identifier l'avantage de l'interaction entre la protéine AIDA-I et l'apolipoprotéine A-I. L'interaction entre l'apolipoprotéine A-I et AIDA-I doit être caractérisée en détail afin d'obtenir un aperçu de l'avantage conféré par cette association. Cependant, comment pourrions nous définir spécifiquement l'interaction entre AIDA-I et l'apolipoprotéine A-I? L'étude de l'interaction au niveau strictement protéique ainsi qu'au niveau de l'ensemble de la pathogenèse pourrait nous renseigner sur le dessein d'une telle interaction. Au niveau strictement protéique, il serait intéressant de déterminer les résidus impliqués lors de la liaison AIDA-I - apolipoprotéine A-I afin de mieux comprendre et visualiser l'association entre les deux protéines. L'identification du motif ainsi que des résidus importants pour l'interaction entre les deux protéines pourrait permettre d'identifier d'autres récepteurs potentiels. Au niveau de la pathogenèse, l'étude des conséquences engendrées par l'interaction permettrait de répondre à la question primordiale suivante : l'interaction AIDA-I – apolipoprotéine A-I est-elle bénéfique pour la bactérie ou pour l'hôte infecté? Il a été préalablement exposé que certains pathogènes possèdent la capacité d'utiliser diverses apolipoprotéines afin de leur permettre soit d'échapper au système immunitaire de l'hôte soit d'augmenter leur niveau de pathogénicité. Il a été également avancé que l'hôte possède la capacité de promouvoir l'interaction entre une apolipoprotéine et un pathogène afin de se protéger contre l'infection par ce dernier. L'étude de l'implication de cette interaction lors des phénomènes d'adhésion et/ou d'invasion de la bactérie sur les cellules-hôtes permettrait d'apporter quelques réponses. En effet, l'étude de l'adhésion bactérienne sur des lignées cellulaires épithéliales en présence et en absence d'apolipoprotéine A-I permettrait de déterminer si l'interaction avec l'apolipoprotéine A-I permet d'augmenter ou de diminuer la pathogenèse grâce à l'observation d'une variation au niveau des phénotypes d'adhésion et/ou d'invasion de la bactérie. De plus, l'étude de la capacité des macrophages à reconnaître et à absorber les *E. coli* présentant AIDA-I lié ou non à l'apolipoprotéine A-I ainsi que l'analyse de la sécrétion des cytokines par les macrophages pourrait faire, en partie, la lumière sur

l'implication de cette interaction au niveau du système immunitaire inné. Finalement, si l'interaction est bénéfique pour l'hôte infecté, il serait intéressant de déterminer le mécanisme exact par lequel l'apolipoprotéine A-I reconnaît le pathogène et quel est le bénéfice retiré de cette interaction par l'hôte.

CONCLUSION

L'objectif général du projet de recherche consistait à approfondir les connaissances sur l'AT AIDA-I, plus particulièrement à ce qui a trait à son implication dans les fonctions d'adhésion et d'invasion de la cellule-hôte engagés par cet AT. Les connaissances acquises lors du projet peuvent être divisées en deux sous-sections majeures, soit la recherche d'un récepteur pour les fonctions d'adhésion et d'invasion ainsi que l'analyse de la survie intracellulaire des bactéries après l'invasion causée par AIDA-I.

L'adhésion, en tant qu'étape initiale de l'infection, est perçue comme très importante lors du développement de la pathogenèse. Des études préalables réalisées par Laarmann et Schmidt ainsi que par Fang et *al.* ont investigué et identifié différentes protéines en tant que récepteurs potentiels pour AIDA-I (45, 90). Cependant, ces deux études n'ont pas caractérisé l'interaction entre AIDA-I et le récepteur potentiel purifié. De plus, ces études n'ont pas investigué en profondeur l'importance de l'interaction AIDA-I / récepteur potentiel lors des processus d'adhésion, d'invasion, d'autoaggrégation ou de formation de biofilm. Notre étude sur la recherche d'un récepteur potentiel dans le sérum porcin a permis d'isoler et d'identifier l'apolipoprotéine A-I grâce à deux méthodes distinctes : la chromatographie d'affinité et le fractionnement. L'interaction entre l'apolipoprotéine A-I humaine et AIDA-I à partir de protéines purifiées a été démontrée par ELISA. L'interaction a également été démontrée lors du processus d'adhésion grâce à la microscopie à fluorescence, puisque les bactéries adhérees via AIDA-I colocalisent avec l'apolipoprotéine A-I à la surface des cellules épithéliales Hep-2 en culture. Ces découvertes permettent d'établir la présence d'une relation entre l'apolipoprotéine A-I et AIDA-I soit lors d'une ou plusieurs fonctions causées par AIDA-I ou bien lors du processus entamé par l'hôte pour se défendre contre le pathogène.

L'étude du phénotype d'invasion causée par l'AT AIDA-I permet d'établir que cet AT possède la capacité de promouvoir l'invasion de cellules épithéliales en culture mais que sa présence unique n'est pas suffisante pour promouvoir la survie intracellulaire des bactéries. L'étude de l'invasion et de la survie intracellulaire de la souche sauvage 2787 laisse sous-entendre que celle-ci possèdent des facteurs de

virulence, autres que l'autotransporteur AIDA-I, qui jouent un rôle primordial lors de la survie intracellulaire.

Les études rapportées dans ce mémoire impliquent les phénotypes d'adhésion et d'invasion causés par l'AT AIDA-I. L'énigme entourant l'utilité et le dessin d'une interaction entre l'autotransporteur AIDA-I et l'apolipoprotéine A-I incite à poursuivre les recherches dans ce domaine. Également, la capacité de la souche sauvage 2787 à survivre à l'intérieur des cellules-hôtes contrairement à la souche de laboratoire C600 n'exprimant qu'AIDA-I comme facteur de virulence, laisse place à de beaux projets portant, entre-autre, sur l'identification du ou des gène(s) procurant ce phénotype à la bactérie.

BIBLIOGRAPHIE

1. **Abraham, S. N., M. J. Duncan, G. Li, and D. Zaas.** 2005. Bacterial penetration of the mucosal barrier by targeting lipid rafts. *J Investig Med* **53**:318-21.
2. **Aebi, C., E. R. Lafontaine, L. D. Cope, J. L. Latimer, S. L. Lumbley, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 1998. Phenotypic effect of isogenic uspA1 and uspA2 mutations on *Moraxella catarrhalis* 035E. *Infect Immun* **66**:3113-9.
3. **Alaupovic, P.** 1982. The role of apolipoproteins in lipid transport processes. *Ric Clin Lab* **12**:3-21.
4. **Anderson, B. E., G. A. McDonald, D. C. Jones, and R. L. Regnery.** 1990. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences. *Infect Immun* **58**:2760-9.
5. **Anderson, B. N., A. M. Ding, L. M. Nilsson, K. Kusuma, V. Tchesnokova, V. Vogel, E. V. Sokurenko, and W. E. Thomas.** 2007. Weak rolling adhesion enhances bacterial surface colonization. *J Bacteriol* **189**:1794-802.
6. **Apel, D., and M. G. Surette.** 2008. Bringing order to a complex molecular machine: the assembly of the bacterial flagella. *Biochim Biophys Acta* **1778**:1851-8.
7. **Aprikian, P., V. Tchesnokova, B. Kidd, O. Yakovenko, V. Yarov-Yarovoy, E. Trinchina, V. Vogel, W. Thomas, and E. Sokurenko.** 2007. Interdomain interaction in the FimH adhesin of *Escherichia coli* regulates the affinity to mannose. *J Biol Chem* **282**:23437-46.
8. **Asakawa, R., H. Komatsuzawa, T. Kawai, S. Yamada, R. B. Goncalves, S. Izumi, T. Fujiwara, Y. Nakano, N. Suzuki, Y. Uchida, K. Ouhara, H. Shiba, M. A. Taubman, H. Kurihara, and M. Sugai.** 2003. Outer membrane protein 100, a versatile virulence factor of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Mol Microbiol* **50**:1125-39.
9. **Ashgar, S. S., N. J. Oldfield, K. G. Wooldridge, M. A. Jones, G. J. Irving, D. P. Turner, and D. A. Ala'Aldeen.** 2007. CapA, an autotransporter protein of *Campylobacter jejuni*, mediates association with human epithelial cells and colonization of the chicken gut. *J Bacteriol* **189**:1856-65.
10. **Benga, W. J., S. E. Krieger, M. Dimitrova, M. B. Zeisel, M. Parnot, J. Lupberger, E. Hildt, G. Luo, J. McLauchlan, T. F. Baumert, and C. Schuster.** Apolipoprotein E interacts with hepatitis C virus nonstructural protein 5A and determines assembly of infectious particles. *Hepatology* **51**:43-53.
11. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. *Mol Microbiol* **6**:1539-46.
12. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:1506-11.
13. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1993. Diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* strains--processing of AIDA-I. *Zentralbl Bakteriell* **278**:197-208.
14. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 2001. Glycosylation with heptose residues mediated by the aah gene product is essential for adherence of the AIDA-I adhesin. *Mol Microbiol* **40**:1403-13.
15. **Bos, M. P., V. Robert, and J. Tommassen.** 2007. Biogenesis of the gram-negative bacterial outer membrane. *Annu Rev Microbiol* **61**:191-214.

16. **Boyle, E. C., and B. B. Finlay.** 2003. Bacterial pathogenesis: exploiting cellular adherence. *Curr Opin Cell Biol* **15**:633-9.
17. **Burrows, L. L.** 2005. Weapons of mass retraction. *Mol Microbiol* **57**:878-88.
18. **Capitani, G., O. Eidam, R. Glockshuber, and M. G. Grutter.** 2006. Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes Infect* **8**:2284-90.
19. **Chang, K. S., J. Jiang, Z. Cai, and G. Luo.** 2007. Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J Virol* **81**:13783-93.
20. **Chapman, M. R., L. S. Robinson, J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, M. Hammar, S. Normark, and S. J. Hultgren.** 2002. Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science* **295**:851-5.
21. **Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez.** 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**:8504-12.
22. **Charbonneau, M. E., and M. Mourez.** 2007. Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* **189**:9020-9.
23. **Cho, N. H., and S. Y. Seong.** 2009. Apolipoproteins inhibit the innate immunity activated by necrotic cells or bacterial endotoxin. *Immunology* **128**:e479-86.
24. **Cole, L. E., T. H. Kawula, K. L. Toffer, and C. Elkins.** 2002. The *Haemophilus ducreyi* serum resistance antigen DsrA confers attachment to human keratinocytes. *Infect Immun* **70**:6158-65.
25. **Comanducci, M., S. Bambini, B. Brunelli, J. Adu-Bobie, B. Arico, B. Capecchi, M. M. Giuliani, V. Massignani, L. Santini, S. Savino, D. M. Granoff, D. A. Caugant, M. Pizza, R. Rappuoli, and M. Mora.** 2002. NadA, a novel vaccine candidate of *Neisseria meningitidis*. *J Exp Med* **195**:1445-54.
26. **Courtney, H. S., Y. M. Zhang, M. W. Frank, and C. O. Rock.** 2006. Serum opacity factor, a streptococcal virulence factor that binds to apolipoproteins A-I and A-II and disrupts high density lipoprotein structure. *J Biol Chem* **281**:5515-21.
27. **Craig, L., M. E. Pique, and J. A. Tainer.** 2004. Type IV pilus structure and bacterial pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **2**:363-78.
28. **Crowther, L. J., R. P. Anantha, and M. S. Donnenberg.** 2004. The inner membrane subassembly of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus machine. *Mol Microbiol* **52**:67-79.
29. **Croxen, M. A., and B. B. Finlay.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**:26-38.
30. **Daniel, A., A. Singh, L. J. Crowther, P. J. Fernandes, W. Schreiber, and M. S. Donnenberg.** 2006. Interaction and localization studies of enteropathogenic *Escherichia coli* type IV bundle-forming pilus outer membrane components. *Microbiology* **152**:2405-20.
31. **Daniell, S. J., E. Kocsis, E. Morris, S. Knutton, F. P. Booy, and G. Frankel.** 2003. 3D structure of EspA filaments from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **49**:301-8.
32. **Danielsen, E. M., G. H. Hansen, and M. D. Poulsen.** 1993. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol* **120**:1347-56.

33. **Darfeuille-Michaud, A.** 2002. Adherent-invasive *Escherichia coli*: a putative new *E. coli* pathotype associated with Crohn's disease. *Int J Med Microbiol* **292**:185-93.
34. **Dautin, N., and H. D. Bernstein.** 2007. Protein secretion in gram-negative bacteria via the autotransporter pathway. *Annu Rev Microbiol* **61**:89-112.
35. **DebRoy, C., and C. W. Maddox.** 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim Health Res Rev* **2**:129-40.
36. **DebRoy, C., E. Roberts, W. Scheuchenzuber, S. Kariyawasam, and B. M. Jayarao.** 2009. Comparison of genotypes of *Escherichia coli* strains carrying F18ab and F18ac fimbriae from pigs. *J Vet Diagn Invest* **21**:359-64.
37. **Desvaux, M., N. J. Parham, and I. R. Henderson.** 2004. The autotransporter secretion system. *Res Microbiol* **155**:53-60.
38. **Desvaux, M., N. J. Parham, and I. R. Henderson.** 2004. Type V protein secretion: simplicity gone awry? *Curr Issues Mol Biol* **6**:111-24.
39. **Doerrler, W. T.** 2006. Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* **60**:542-52.
40. **Dorsey, C. W., M. C. Laarakker, A. D. Humphries, E. H. Weening, and A. J. Baumler.** 2005. *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* MisL is an intestinal colonization factor that binds fibronectin. *Mol Microbiol* **57**:196-211.
41. **Dziva, F., and M. P. Stevens.** 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathol* **37**:355-66.
42. **Elsinghorst, E. A., and J. A. Weitz.** 1994. Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic *Escherichia coli* tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein. *Infect Immun* **62**:3463-71.
43. **Fagan, R. P., M. A. Lambert, and S. G. Smith.** 2008. The hek outer membrane protein of *Escherichia coli* strain RS218 binds to proteoglycan and utilizes a single extracellular loop for adherence, invasion, and autoaggregation. *Infect Immun* **76**:1135-42.
44. **Fairbrother, J. M., E. Nadeau, and C. L. Gyles.** 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**:17-39.
45. **Fang, Y., M. Ngeleka, D. M. Middleton, and E. Simko.** 2008. Isolation and identification of AIDA-I receptors in porcine intestinal mucus. *Vet Microbiol* **126**:345-55.
46. **Fernandez, R. C., and A. A. Weiss.** 1994. Cloning and sequencing of a *Bordetella pertussis* serum resistance locus. *Infect Immun* **62**:4727-38.
47. **Fexby, S., T. Bjarnsholt, P. O. Jensen, V. Roos, N. Hoiby, M. Givskov, and P. Klemm.** 2007. Biological Trojan horse: Antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils. *Infect Immun* **75**:30-4.
48. **Field, F. J., and S. N. Mathur.** 1995. Intestinal lipoprotein synthesis and secretion. *Prog Lipid Res* **34**:185-98.
49. **Fine, D. H., K. Velliyagounder, D. Furgang, and J. B. Kaplan.** 2005. The *Actinobacillus actinomycetemcomitans* autotransporter adhesin Aae exhibits specificity for buccal epithelial cells from humans and old world primates. *Infect Immun* **73**:1947-53.

50. **Fink, D. L., A. Z. Buscher, B. Green, P. Fernsten, and J. W. St Geme, 3rd.** 2003. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol* **5**:175-86.
51. **Fink, D. L., B. A. Green, and J. W. St Geme, 3rd.** 2002. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin, and collagen IV. *Infect Immun* **70**:4902-7.
52. **Finlay, B. B., and M. Caparon.** 2005. Chapter 5 : Bacterial Adherence to Cell Surfaces and Extracellular Matrix.
53. **Finn, T. M., and L. A. Stevens.** 1995. Tracheal colonization factor: a *Bordetella pertussis* secreted virulence determinant. *Mol Microbiol* **16**:625-34.
54. **Fleckenstein, J. M., J. T. Holland, and D. L. Hasty.** 2002. Interaction of an outer membrane protein of enterotoxigenic *Escherichia coli* with cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Infect Immun* **70**:1530-7.
55. **Frankel, G., and A. D. Phillips.** 2008. Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol* **10**:549-56.
56. **Frydendahl, K.** 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* **85**:169-82.
57. **Galan, J. E., and H. Wolf-Watz.** 2006. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines. *Nature* **444**:567-73.
58. **Genevaux, P., P. Bauda, M. S. DuBow, and B. Oudega.** 1999. Identification of Tn10 insertions in the rfaG, rfaP, and galU genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol* **172**:1-8.
59. **Gerard, H. C., E. Fomicheva, J. A. Whittum-Hudson, and A. P. Hudson.** 2008. Apolipoprotein E4 enhances attachment of *Chlamydomphila* (Chlamydia) *pneumoniae* elementary bodies to host cells. *Microb Pathog* **44**:279-85.
60. **Gerlach, R. G., and M. Hensel.** 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. *Int J Med Microbiol* **297**:401-15.
61. **Gillen, C. M., H. S. Courtney, K. Schulze, M. Rohde, M. R. Wilson, A. M. Timmer, C. A. Guzman, V. Nizet, G. S. Chhatwal, and M. J. Walker.** 2008. Opacity factor activity and epithelial cell binding by the serum opacity factor protein of *Streptococcus pyogenes* are functionally discrete. *J Biol Chem* **283**:6359-66.
62. **Girard, V., and M. Mourez.** 2006. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Res Microbiol* **157**:407-16.
63. **Giron, J. A., A. G. Torres, E. Freer, and J. B. Kaper.** 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* **44**:361-79.
64. **Gomez-Duarte, O. G., S. Chattopadhyay, S. J. Weissman, J. A. Giron, J. B. Kaper, and E. V. Sokurenko.** 2007. Genetic diversity of the gene cluster encoding longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **189**:9145-9.

65. **Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae.** 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-81.
66. **Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-8.
67. **Han, M., B. K. Gillard, H. S. Courtney, K. Ward, C. Rosales, H. Khant, S. J. Ludtke, and H. J. Pownall.** 2009. Disruption of human plasma high-density lipoproteins by streptococcal serum opacity factor requires labile apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **48**:1481-7.
68. **Han, W., B. Liu, B. Cao, L. Beutin, U. Kruger, H. Liu, Y. Li, Y. Liu, L. Feng, and L. Wang.** 2007. DNA microarray-based identification of serogroups and virulence gene patterns of *Escherichia coli* isolates associated with porcine postweaning diarrhea and edema disease. *Appl Environ Microbiol* **73**:4082-8.
69. **Handattu, S. P., D. W. Garber, C. E. Monroe, T. van Groen, I. Kadish, G. Nayyar, D. Cao, M. N. Palgunachari, L. Li, and G. M. Anantharamaiah.** 2009. Oral apolipoprotein A-I mimetic peptide improves cognitive function and reduces amyloid burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* **34**:525-34.
70. **Hauck, C. R.** 2002. Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. *Med Microbiol Immunol* **191**:55-62.
71. **Hauck, C. R., F. Agerer, P. Muenzner, and T. Schmitter.** 2006. Cellular adhesion molecules as targets for bacterial infection. *Eur J Cell Biol* **85**:235-42.
72. **Heise, T., and P. Dersch.** 2006. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3375-80.
73. **Helgerson, A. F., V. Sharma, A. M. Dow, R. Schroeder, K. Post, and N. A. Cornick.** 2006. Edema disease caused by a clone of *Escherichia coli* O147. *J Clin Microbiol* **44**:3074-7.
74. **Henderson, I. R., and J. P. Nataro.** 2005. Autotransporters proteins-module 8.7.3., In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology* -online.
75. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez, and D. Ala'Aldeen.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:692-744.
76. **Icard, V., O. Diaz, C. Scholtes, L. Perrin-Cocon, C. Ramiere, R. Bartenschlager, F. Penin, V. Lotteau, and P. Andre.** 2009. Secretion of hepatitis C virus envelope glycoproteins depends on assembly of apolipoprotein B positive lipoproteins. *PLoS One* **4**:e4233.
77. **Ilver, D., A. Arnqvist, J. Ogren, I. M. Frick, D. Kersulyte, E. T. Incecik, D. E. Berg, A. Covacci, L. Engstrand, and T. Boren.** 1998. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* **279**:373-7.
78. **Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, C. Rich, and B. Joly.** 1994. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol* **145**:621-32.

79. **Jiao, Y. L., and M. P. Wu.** 2008. Apolipoprotein A-I diminishes acute lung injury and sepsis in mice induced by lipoteichoic acid. *Cytokine* **43**:83-7.
80. **Kim, Y. J., J. H. Kim, J. Hur, and J. H. Lee.** Isolation of *Escherichia coli* from piglets in South Korea with diarrhea and characteristics of the virulence genes. *Can J Vet Res* **74**:59-64.
81. **Kingsley, R. A., D. Abi Ghanem, N. Puebla-Osorio, A. M. Keestra, L. Berghman, and A. J. Baumler.** 2004. Fibronectin binding to the *Salmonella enterica* serotype *Typhimurium* ShdA autotransporter protein is inhibited by a monoclonal antibody recognizing the A3 repeat. *J Bacteriol* **186**:4931-9.
82. **Klemm, P., L. Hjerrild, M. Gjermansen, and M. A. Schembri.** 2004. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **51**:283-96.
83. **Klemm, P., and M. A. Schembri.** 2004. Type 1 fimbriae, Curli, and Antigen 43 : Adhesion, Colonization and Biofilm Formation-module 8.3.2.6., In *Escherichia and Salmonella : cellular and molecular biology-online*.
84. **Klemm, P., R. M. Vejborg, and O. Sherlock.** 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* **296**:187-95.
85. **Kline, K. A., S. Falker, S. Dahlberg, S. Normark, and B. Henriques-Normark.** 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* **5**:580-92.
86. **Kostakioti, M., and C. Stathopoulos.** 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **72**:5548-54.
87. **Kuhlmann, I., A. M. Minihane, P. Huebbe, A. Nebel, and G. Rimbach.** Apolipoprotein E genotype and hepatitis C, HIV and *herpes simplex* disease risk: a literature review. *Lipids Health Dis* **9**:8.
88. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**:27-35.
89. **Laarmann, S., D. Cutter, T. Juehne, S. J. Barenkamp, and J. W. St Geme.** 2002. The *Haemophilus influenzae* Hia autotransporter harbours two adhesive pockets that reside in the passenger domain and recognize the same host cell receptor. *Mol Microbiol* **46**:731-43.
90. **Laarmann, S., and M. A. Schmidt.** 2003. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**:1871-82.
91. **Lafont, F., and F. G. van der Goot.** 2005. Bacterial invasion via lipid rafts. *Cell Microbiol* **7**:613-20.
92. **Lafontaine, E. R., L. D. Cope, C. Aebi, J. L. Latimer, G. H. McCracken, Jr., and E. J. Hansen.** 2000. The UspA1 protein and a second type of UspA2 protein mediate adherence of *Moraxella catarrhalis* to human epithelial cells in vitro. *J Bacteriol* **182**:1364-73.
93. **Lan, R., B. Lumb, D. Ryan, and P. R. Reeves.** 2001. Molecular evolution of large virulence plasmid in Shigella clones and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**:6303-9.

94. **Le Bouguenec, C., and J. P. Nataro.** 2005. Adhesins of Diffusely Adherent and Enteroaggregative *Escherichia coli*-module 8.3.2.2., In *Escherichia and Salmonella* : cellular and molecular biology-online.
95. **Le Bouguenec, C., and A. L. Servin.** 2006. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains expressing Afa/Dr adhesins (Afa/Dr DAEC): hitherto unrecognized pathogens. *FEMS Microbiol Lett* **256**:185-94.
96. **Lebeer, S., J. Vanderleyden, and S. C. De Keersmaecker.** Host interactions of probiotic bacterial surface molecules: comparison with commensals and pathogens. *Nat Rev Microbiol* **8**:171-84.
97. **Leininger, E., M. Roberts, J. G. Kenimer, I. G. Charles, N. Fairweather, P. Novotny, and M. J. Brennan.** 1991. Pertactin, an Arg-Gly-Asp-containing *Bordetella pertussis* surface protein that promotes adherence of mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:345-9.
98. **Levy, E., and M. Bendayan.** 2000. Use of immunoelectron microscopy and intestinal models to explore the elaboration of apolipoproteins required for intraenterocyte lipid transport. *Microsc Res Tech* **49**:374-82.
99. **Leyton, D. L., L. M. Adams, M. Kelly, J. Sloan, M. Tauschek, R. M. Robins-Browne, and E. L. Hartland.** 2007. Contribution of a novel gene, *rpeA*, encoding a putative autotransporter adhesin to intestinal colonization by rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **75**:4664-9.
100. **Lindenthal, C., and E. A. Elsinghorst.** 1999. Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**:4084-91.
101. **Lowe, D., B. Braaten, and M. Van Der Woude.** 2005. Chapter 11 -Fimbriae.
102. **Ma, J., X. L. Liao, B. Lou, and M. P. Wu.** 2004. Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **36**:419-24.
103. **Macnab, R. M.** 2003. How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**:77-100.
104. **Mahdavi, J., B. Sonden, M. Hurtig, F. O. Olfat, L. Forsberg, N. Roche, J. Angstrom, T. Larsson, S. Teneberg, K. A. Karlsson, S. Altraja, T. Wadstrom, D. Kersulyte, D. E. Berg, A. Dubois, C. Petersson, K. E. Magnusson, T. Norberg, F. Lindh, B. B. Lundskog, A. Arnqvist, L. Hammarstrom, and T. Boren.** 2002. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* **297**:573-8.
105. **Martindale, J., D. Stroud, E. R. Moxon, and C. M. Tang.** 2000. Genetic analysis of *Escherichia coli* K1 gastrointestinal colonization. *Mol Microbiol* **37**:1293-305.
106. **Martinez-Medina, M., A. Mora, M. Blanco, C. Lopez, M. P. Alonso, S. Bonacorsi, M. H. Nicolas-Chanoine, A. Darfeuille-Michaud, J. Garcia-Gil, and J. Blanco.** 2009. Similarity and divergence among adherent-invasive *Escherichia coli* and extraintestinal pathogenic *E. coli* strains. *J Clin Microbiol* **47**:3968-79.
107. **Mattsson, S., and P. Wallgren.** 2008. Phenotyping of *E. coli* serotypes associated to oedema disease. *Acta Vet Scand* **50**:13.
108. **McDonald, M. C., P. Dhady, G. W. Cockerill, S. Cuzzocrea, H. Mota-Filipe, C. J. Hinds, N. E. Miller, and C. Thiemermann.** 2003. Reconstituted high-

- density lipoprotein attenuates organ injury and adhesion molecule expression in a rodent model of endotoxic shock. *Shock* **20**:551-7.
109. **McMichael, J. C., M. J. Fiske, R. A. Fredenburg, D. N. Chakravarti, K. R. VanDerMeid, V. Barniak, J. Caplan, E. Bortell, S. Baker, R. Arumugham, and D. Chen.** 1998. Isolation and characterization of two proteins from *Moraxella catarrhalis* that bear a common epitope. *Infect Immun* **66**:4374-81.
 110. **Melin, L., S. Mattsson, M. Katouli, and P. Wallgren.** 2004. Development of post-weaning diarrhoea in piglets. Relation to presence of *Escherichia coli* strains and rotavirus. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:12-22.
 111. **Mintz, K. P.** 2004. Identification of an extracellular matrix protein adhesin, EmaA, which mediates the adhesion of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to collagen. *Microbiology* **150**:2677-88.
 112. **Nabuurs, M. J., E. J. Van De Weijert, A. F. Grootendorst, and T. A. Niewold.** 2001. Oedema disease is associated with metabolic acidosis and small intestinal acidosis. *Res Vet Sci* **70**:247-53.
 113. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
 114. **Navab, M., G. M. Anantharamaiah, S. Hama, D. W. Garber, M. Chaddha, G. Hough, R. Lallone, and A. M. Fogelman.** 2002. Oral administration of an Apo A-I mimetic Peptide synthesized from D-amino acids dramatically reduces atherosclerosis in mice independent of plasma cholesterol. *Circulation* **105**:290-2.
 115. **Netea, M. G., L. A. Joosten, M. Keuter, F. Wagener, A. F. Stalenhoef, J. W. van der Meer, and B. J. Kullberg.** 2009. Circulating lipoproteins are a crucial component of host defense against invasive *Salmonella typhimurium* infection. *PLoS One* **4**:e4237.
 116. **Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
 117. **Niemann, H. H., W. D. Schubert, and D. W. Heinz.** 2004. Adhesins and invasins of pathogenic bacteria: a structural view. *Microbes Infect* **6**:101-12.
 118. **Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
 119. **Nougayrede, J. P., P. J. Fernandes, and M. S. Donnenberg.** 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**:359-72.
 120. **Odenbreit, S., M. Till, D. Hofreuter, G. Faller, and R. Haas.** 1999. Genetic and functional characterization of the alpAB gene locus essential for the adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric tissue. *Mol Microbiol* **31**:1537-48.
 121. **Oelschlaeger, T. A.** 2001. Adhesins as invasins. *Int J Med Microbiol* **291**:7-14.
 122. **Ogawa, M., Y. Handa, H. Ashida, M. Suzuki, and C. Sasakawa.** 2008. The versatility of *Shigella* effectors. *Nat Rev Microbiol* **6**:11-6.

123. **Oliver, D. C., G. Huang, E. Nodel, S. Pleasance, and R. C. Fernandez.** 2003. A conserved region within the *Bordetella pertussis* autotransporter BrkA is necessary for folding of its passenger domain. *Mol Microbiol* **47**:1367-83.
124. **Olofsson, S. O., O. Wiklund, and J. Boren.** 2007. Apolipoproteins A-I and B: biosynthesis, role in the development of atherosclerosis and targets for intervention against cardiovascular disease. *Vasc Health Risk Manag* **3**:491-502.
125. **Pajkrt, D., J. E. Doran, F. Koster, P. G. Lerch, B. Arnet, T. van der Poll, J. W. ten Cate, and S. J. van Deventer.** 1996. Antiinflammatory effects of reconstituted high-density lipoprotein during human endotoxemia. *J Exp Med* **184**:1601-8.
126. **Pallen, M. J., R. R. Chaudhuri, and I. R. Henderson.** 2003. Genomic analysis of secretion systems. *Curr Opin Microbiol* **6**:519-27.
127. **Paradis, S. E., D. Dubreuil, S. Rioux, M. Gottschalk, and M. Jacques.** 1994. High-molecular-mass lipopolysaccharides are involved in *Actinobacillus pleuropneumoniae* adherence to porcine respiratory tract cells. *Infect Immun* **62**:3311-9.
128. **Paton, A. W., P. Srimanote, M. C. Woodrow, and J. C. Paton.** 2001. Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans. *Infect Immun* **69**:6999-7009.
129. **Pautsch, A., and G. E. Schulz.** 2000. High-resolution structure of the OmpA membrane domain. *J Mol Biol* **298**:273-82.
130. **Pearson, M. M., E. R. Lafontaine, N. J. Wagner, J. W. St Geme, 3rd, and E. J. Hansen.** 2002. A hag mutant of *Moraxella catarrhalis* strain O35E is deficient in hemagglutination, autoagglutination, and immunoglobulin D-binding activities. *Infect Immun* **70**:4523-33.
131. **Peterson, M. M., J. L. Mack, P. R. Hall, A. A. Alsup, S. M. Alexander, E. K. Sully, Y. S. Sawires, A. L. Cheung, M. Otto, and H. D. Gresham.** 2008. Apolipoprotein B Is an innate barrier against invasive *Staphylococcus aureus* infection. *Cell Host Microbe* **4**:555-66.
132. **Pizarro-Cerda, J., and P. Cossart.** 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**:715-27.
133. **Preissner, K. T., and G. S. Chhatwal.** 2005. Chapter 4 : Extracellular Matrix and Host Cell Surfaces : Potential Sites of Pathogen Interaction.
134. **Ramer, S. W., G. K. Schoolnik, C. Y. Wu, J. Hwang, S. A. Schmidt, and D. Bieber.** 2002. The type IV pilus assembly complex: biogenic interactions among the bundle-forming pilus proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:3457-65.
135. **Ravi, M., M. Ngeleka, S. H. Kim, C. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. Middleton, and E. Simko.** 2007. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**:308-19.
136. **Riess, T., S. G. Andersson, A. Lupas, M. Schaller, A. Schafer, P. Kyme, J. Martin, J. H. Wazlein, U. Eehalt, H. Lindroos, M. Schirle, A. Nordheim, I. B. Autenrieth, and V. A. Kempf.** 2004. *Bartonella* adhesin a mediates a proangiogenic host cell response. *J Exp Med* **200**:1267-78.

137. **Robins-Browne, R. M., and E. L. Hartland.** 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* **17**:467-75.
138. **Robinson, L. S., E. M. Ashman, S. J. Hultgren, and M. R. Chapman.** 2006. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol* **59**:870-81.
139. **Roggenkamp, A., H. R. Neuberger, A. Flugel, T. Schmoll, and J. Heesemann.** 1995. Substitution of two histidine residues in YadA protein of *Yersinia enterocolitica* abrogates collagen binding, cell adherence and mouse virulence. *Mol Microbiol* **16**:1207-19.
140. **Rosales, C., B. K. Gillard, H. S. Courtney, F. Blanco-Vaca, and H. J. Pownall.** 2009. Apolipoprotein modulation of streptococcal serum opacity factor activity against human plasma high-density lipoproteins. *Biochemistry* **48**:8070-6.
141. **Roux, A., C. Beloin, and J. M. Ghigo.** 2005. Combined inactivation and expression strategy to study gene function under physiological conditions: application to identification of new *Escherichia coli* adhesins. *J Bacteriol* **187**:1001-13.
142. **Russell, D. G.** 2005. Chapter 10 : Where to Stay inside the Cell: a Homesteader's Guide to Intracellular Parasitism
143. **Rutherford, N., and M. Mourez.** 2006. Surface display of proteins by gram-negative bacterial autotransporters. *Microb Cell Fact* **5**:22.
144. **Sandt, C. H., and C. W. Hill.** 2000. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**:2205-14.
145. **Scaletsky, I. C., M. Z. Pedroso, M. B. Morais, R. L. Carvalho, R. M. Silva, S. H. Fabbriotti, and U. Fagundes-Neto.** 1999. [Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea]. *Arq Gastroenterol* **36**:54-60.
146. **Scarselli, M., D. Serruto, P. Montanari, B. Capecchi, J. Adu-Bobie, D. Veggi, R. Rappuoli, M. Pizza, and B. Arico.** 2006. *Neisseria meningitidis* NhhA is a multifunctional trimeric autotransporter adhesin. *Mol Microbiol* **61**:631-44.
147. **Schifferli, D. M.** 2005. Adhesins of Enterotoxigenic *Escherichia coli* strains that infect animals-chapter 8.3.2.1.2, In *Escherichia and Salmonella* : cellular and molecular biology-online.
148. **Schroeder, G. N., and H. Hilbi.** 2008. Molecular pathogenesis of *Shigella spp.*: controlling host cell signaling, invasion, and death by type III secretion. *Clin Microbiol Rev* **21**:134-56.
149. **Serruto, D., J. Adu-Bobie, M. Scarselli, D. Veggi, M. Pizza, R. Rappuoli, and B. Arico.** 2003. *Neisseria meningitidis* App, a new adhesin with autocatalytic serine protease activity. *Mol Microbiol* **48**:323-34.
150. **Shaw, R. K., S. Daniell, F. Ebel, G. Frankel, and S. Knutton.** 2001. EspA filament-mediated protein translocation into red blood cells. *Cell Microbiol* **3**:213-22.
151. **Shin, S., G. Lu, M. Cai, and K. S. Kim.** 2005. *Escherichia coli* outer membrane protein A adheres to human brain microvascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **330**:1199-204.

152. **Sigma-Aldrich**, posting date. Plasma and Blood Related Proteins -Plasma derivated Proteins and Enzymes -Lipoproteins. [Online.]
153. **Sijbrandi, R., M. L. Urbanus, C. M. ten Hagen-Jongman, H. D. Bernstein, B. Oudega, B. R. Otto, and J. Luirink.** 2003. Signal recognition particle (SRP)-mediated targeting and Sec-dependent translocation of an extracellular *Escherichia coli* protein. *J Biol Chem* **278**:4654-9.
154. **Smith, J. L., P. M. Fratamico, and N. W. Gunther.** 2007. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne Pathog Dis* **4**:134-63.
155. **Smith, S. G., V. Mahon, M. A. Lambert, and R. P. Fagan.** 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett* **273**:1-11.
156. **Sokurenko, E. V., V. Chesnokova, D. E. Dykhuizen, I. Ofek, X. R. Wu, K. A. Krogfelt, C. Struve, M. A. Schembri, and D. L. Hasty.** 1998. Pathogenic adaptation of *Escherichia coli* by natural variation of the FimH adhesin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:8922-6.
157. **Sokurenko, E. V., H. S. Courtney, J. Maslow, A. Siitonen, and D. L. Hasty.** 1995. Quantitative differences in adhesiveness of type 1 fimbriated *Escherichia coli* due to structural differences in fimH genes. *J Bacteriol* **177**:3680-6.
158. **Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**:1059-71.
159. **St Geme, J. W., 3rd, D. Cutter, and S. J. Barenkamp.** 1996. Characterization of the genetic locus encoding *Haemophilus influenzae* type b surface fibrils. *J Bacteriol* **178**:6281-7.
160. **Stahl, C. H., T. R. Callaway, L. M. Lincoln, S. M. Lonergan, and K. J. Genovese.** 2004. Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3119-21.
161. **Stevens, M. P., and T. Wallis.** 2005. Adhesins of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* -module 8.3.2.3., In *Escherichia and Salmonella* : cellular and molecular biology-online.
162. **Stoffel, W.** 1984. Synthesis, transport, and processing of apolipoproteins of high density lipoproteins. *J Lipid Res* **25**:1586-92.
163. **Suhr, M., I. Benz, and M. A. Schmidt.** 1996. Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol Microbiol* **22**:31-42.
164. **Tada, N., T. Sakamoto, A. Kagami, K. Mochizuki, and K. Kurosaka.** 1993. Antimicrobial activity of lipoprotein particles containing apolipoprotein AI. *Mol Cell Biochem* **119**:171-8.
165. **Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, and T. E. Besser.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**:1400-7.
166. **Timpe, J. M., M. M. Holm, S. L. Vanlerberg, V. Basrur, and E. R. Lafontaine.** 2003. Identification of a *Moraxella catarrhalis* outer membrane protein exhibiting both adhesin and lipolytic activities. *Infect Immun* **71**:4341-50.

167. **Torres, A. G.** 2006. Adhesins of Enteropathogenic *Escherichia coli*-module 8.3.2.4, In *Escherichia* and *Salmonella* : cellular and molecular biology-online.
168. **Torres, A. G., and J. B. Kaper.** 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* **71**:4985-95.
169. **Torres, A. G., N. T. Perna, V. Burland, A. Ruknudin, F. R. Blattner, and J. B. Kaper.** 2002. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **45**:951-66.
170. **Torres, A. G., X. Zhou, and J. B. Kaper.** 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun* **73**:18-29.
171. **Trent, M. S.** 2004. Biosynthesis, transport, and modification of lipid A. *Biochem Cell Biol* **82**:71-86.
172. **Tsukahara, T., N. Nakanishi, K. Nakayama, N. Matsubara, and K. Ushida.** 2005. Experimental infection of enterotoxemic *Escherichia coli* associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. *J Vet Med Sci* **67**:1167-71.
173. **Turner, D. P., A. G. Marietou, L. Johnston, K. K. Ho, A. J. Rogers, K. G. Wooldridge, and D. A. Ala'Aldeen.** 2006. Characterization of MspA, an immunogenic autotransporter protein that mediates adhesion to epithelial and endothelial cells in *Neisseria meningitidis*. *Infect Immun* **74**:2957-64.
174. **Uchiyama, T.** 2003. Adherence to and invasion of Vero cells by recombinant *Escherichia coli* expressing the outer membrane protein rOmpB of *Rickettsia japonica*. *Ann N Y Acad Sci* **990**:585-90.
175. **Valdivia, R. H., and S. Falkow.** 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol* **22**:367-78.
176. **Valle, J., A. N. Mabbett, G. C. Ulett, A. Toledo-Arana, K. Wecker, M. Totsika, M. A. Schembri, J. M. Ghigo, and C. Beloin.** 2008. UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **190**:4147-61.
177. **van Beers-Schreurs, H. M. G.** 1996. The changes in the function of the large intestine of weaned pigs.
178. **Van Lenten, B. J., A. C. Wagner, G. M. Anantharamaiah, M. Navab, S. T. Reddy, G. M. Buga, and A. M. Fogelman.** 2009. Apolipoprotein A-I mimetic peptides. *Curr Atheroscler Rep* **11**:52-7.
179. **Verdonck, F., P. Tiels, K. van Gog, B. M. Goddeeris, N. Lycke, J. Clements, and E. Cox.** 2007. Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ *Escherichia coli* infection. *Vet Immunol Immunopathol* **120**:69-79.
180. **Vreugdenhil, A. C., A. M. Snoek, J. W. Greve, and W. A. Buurman.** 2000. Lipopolysaccharide-binding protein is vectorially secreted and transported by cultured intestinal epithelial cells and is present in the intestinal mucus of mice. *J Immunol* **165**:4561-6.
181. **Wehrl, W., V. Brinkmann, P. R. Jungblut, T. F. Meyer, and A. J. Szczepek.** 2004. From the inside out--processing of the Chlamydial autotransporter PmpD

- and its role in bacterial adhesion and activation of human host cells. *Mol Microbiol* **51**:319-34.
182. **Wells, T. J., O. Sherlock, L. Rivas, A. Mahajan, S. A. Beatson, M. Torpdahl, R. I. Webb, L. P. Allsopp, K. S. Gobius, D. L. Gally, and M. A. Schembri.** 2008. EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation. *Environ Microbiol* **10**:589-604.
 183. **Wiles, T. J., R. R. Kulesus, and M. A. Mulvey.** 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* **85**:11-9.
 184. **Zhang, P., B. B. Chomel, M. K. Schau, J. S. Goo, S. Droz, K. L. Kelminson, S. S. George, N. W. Lerche, and J. E. Koehler.** 2004. A family of variably expressed outer-membrane proteins (Vomp) mediates adhesion and autoaggregation in *Bartonella quintana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13630-5.
 185. **Zhang, W., M. Zhao, L. Ruesch, A. Omot, and D. Francis.** 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**:145-52.
 186. **Zhang, Z., G. Datta, Y. Zhang, A. P. Miller, P. Mochon, Y. F. Chen, J. Chatham, G. M. Anantharamaiah, and C. R. White.** 2009. Apolipoprotein A-I mimetic peptide treatment inhibits inflammatory responses and improves survival in septic rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **297**:H866-73.
 187. **Zhao, L., X. Chen, X. Xu, G. Song, and X. Liu.** 2009. Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *Vet J* **180**:124-9.

ANNEXE 1

INTRODUCTION

Les producteurs de l'industrie porcine dépensent chaque année des sommes faramineuses afin de contrer les maladies qui affectent leur cheptel. Deux de ces maladies, la diarrhée post-sevrage et la maladie de l'œdème, affectent les porcelets principalement lors des deux semaines suivant leur sevrage. Le sevrage est une étape de la croissance du porcelet qui engendre un stress alimentaire et comportemental important qui peut provoquer l'affaiblissement des défenses immunitaires. La maladie de l'œdème est principalement causée par les *E. coli* qui adhèrent au petit intestin via le fimbriae F18 et qui expriment la Shiga-toxine 2e (Stx2e) (73, 112, 172). La diarrhée post-sevrage est principalement causée par les *E. coli* qui adhèrent au jéjunum et à l'iléum grâce à divers facteurs d'attachement (ex. F4, F18) et qui expriment une ou plusieurs entérotoxines (STa, STb, LT, EAST1) (36, 56, 65, 66, 68, 118, 160, 179). Plusieurs études ont établi la prévalence des facteurs de virulence dans les *E. coli* isolées des porcelets affectés par la maladie de l'œdème ou la diarrhée post-sevrage. L'un des facteurs de virulence étudié est l'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA-I). L'étude de la prévalence de cette adhésine chez les porcelets atteints de la maladie de l'œdème ou de la diarrhée post-sevrage est intéressante puisqu'une étude a démontré qu'AIDA-I, usuellement en association avec la toxine bactérienne STb, est un facteur de virulence contribuant de façon importante au développement d'une diarrhée sévère chez les porcelets (135). Une étude réalisée par Zhang et al. en 2007 aux États-Unis, a établi que 26.9% des isolats de *E. coli* de porcs présentant une diarrhée post-sevrage possédaient les gènes codant pour l'adhésine AIDA-I (185). D'autres études effectuées sur les cas de diarrhée post-sevrage et maladie de l'œdème à travers le monde ont démontré une présence variable pour l'adhésine AIDA-I (12, 65, 68, 78, 116, 118, 145, 187).

La capacité d'envahir les cellules épithéliales offre aux pathogènes la possibilité d'établir une niche intracellulaire qui les protège contre les attaques du milieu extérieur et qui leur permet de persister à l'intérieur de l'hôte d'où elles peuvent redémarrer le processus d'infection rapidement (29, 85). Les bactéries pathogènes ont développé plusieurs stratégies leur permettant d'envahir les cellules. L'invasion peut être effectuée

via deux mécanismes : l'endocytose induite et l'invasion active. L'invasion par endocytose induite a lieu lorsque la bactérie injecte des effecteurs dans une cellule-hôte afin de stimuler son invasion à l'intérieur de cellules non-phagocytaires. Lors de ce type d'invasion, la bactérie et la cellule-hôte sont actives. L'invasion active, contrairement au mécanisme précédent, consiste en l'invasion de la cellule-hôte sans déclencher de mouvements contractiles de la cellule-hôte. Ainsi, seule la bactérie est active lors de ce processus d'invasion (132, 142). Certains membres du groupe des AT confèrent le phénotype d'invasion aux bactéries qui les expriment.

La présente étude investigate la capacité de l'adhésine AIDA-I à induire l'invasion des bactéries à l'intérieur des cellules épithéliales Hep-2 en culture et examine également l'évolution de la survie intracellulaire de ces bactéries. L'analyse des résultats démontre que l'adhésine AIDA-I induit l'invasion des cellules épithéliales en culture sans toutefois permettre la survie des bactéries à l'intérieur de la cellule.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Souches bactériennes et plasmides. Au cours de cette étude, la souche *Escherichia coli* K12 C600 (*thr-1*, *leuB6*, *thi-1*, *lacY1*, *supE44*, *rfbD1*, *fhuA21*; obtenue de New England Biolabs) a été utilisée. Le plasmide pAg contenant l'opéron *aidA* (*aah* et *aidA*) sous le contrôle du promoteur *ptrc*, un promoteur inductible à l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG), comme décrit précédemment, a été utilisé (21). pAg permet l'expression d'AIDA-I glycosylée. La souche *E. coli* 2787 (12) (souche de cas clinique de porc, virotype O126 :H27; exprimant AIDA-I) a été généreusement offerte par le Dr John Morris Fairbrother (Laboratoire de référence *E. coli*, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal).

Test d'invasion et cinétique d'invasion. Le test d'invasion est adapté du test de Benz and Schmidt en 1989 (12). Brièvement, les cellules Hep-2 sont cultivées dans du DMEM sans antibiotique jusqu'à confluence. Les souches d'*E. coli* C600 contenant les

plasmides pTRC99a ou pAg ou la souche *E. coli* 2787 sont incubées à 30°C pendant 16 à 18 heures croissent toute la nuit à 30°C dans du LB contenant de l'ampicilline. Les cellules sont incubées avec 10⁶ bactéries dans le milieu de culture à 37°C pour 3 heures. Après lavages avec du DPBS (Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), les cellules Hep-2 et les bactéries sont incubées dans du DMEM contenant de la gentamicine à 37°C pour 2 heures (Test standard (S)) ou plus (3 heures, 5 heures, 8 heures, 20 heures). Après 3 nombre lavages avec du DPBS, les cellules sont lysées par l'ajout de Triton X-100 (1%) pendant 10 minutes, reprises dans du LB puis étalé sur gélose pour le décompte en unité formatrice de colonie. Un contrôle négatif d'invasion est obtenu par le traitement des cellules 30 min avant l'infection avec la cythocalasine D à 0.1 µg/ml.

RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les bactéries K-12 exprimant AIDA-I envahissent les cellules épithéliales Hep-2. Le rôle exact de l'adhésine AIDA-I lors du processus d'invasion des cellules n'a pas été défini précisément. Afin d'étudier ce phénomène, la souche *E. coli* K-12 C600 n'exprimant que l'adhésine AIDA-I comme facteur de virulence a été utilisée afin d'infecter des cellules épithéliales Hep-2 en culture. Le nombre important d'unité formatrice de colonies (UFC) d'*E. coli* C600 exprimant AIDA-I obtenu suite au traitement à la gentamicine indique que ces dernière possèdent la capacité d'envahir les cellules épithéliales Hep-2. Le très bas nombre d'UFC obtenu après traitement à la gentamicine pour la souche *E. coli* C600 possédant le vecteur vide pTRC99a suggère que cette souche n'as pas la capacité d'envahir les cellules Hep-2 (Figure 1). Le contrôle négatif pour le test d'invasion est obtenu par l'association entre le traitement des cellules à la cythocalasine D et le traitement à la gentamicine. La cythocalasine D est un composé toxique qui inhibe la polymérisation de l'actine des cellules hôte ce qui bloque l'invasion par les bactéries. La gentamicine élimine alors les bactéries demeurées à l'extérieur des cellules ce qui représente un contrôle négatif d'invasion des cellules.

Les bactéries K-12 exprimant AIDA-I ne survivent pas à l'intérieur des cellules Hep-2. L'expérience précédente a permis de démontrer l'aptitude de l'adhésine AIDA-I à promouvoir l'invasion de la bactérie dans la cellule épithéliale. Cependant, il serait intéressant de déterminer si l'expression d'AIDA-I permet la survie subséquente des bactéries à l'intérieur de la cellule. Afin d'éclaircir ce point, une cinétique d'invasion a été effectuée afin de déterminer la survie des bactéries à 1 heure, 3 heures, 6 heures et 18 heures après le test standard (S). L'analyse de la survie des *E. coli* exprimant AIDA-I démontre une baisse rapide et soutenue du nombre de bactéries vivantes à l'intérieur des cellules. En effet, après 1 heure, le nombre de bactéries vivantes (UFC) à l'intérieur des cellules chute de façon importante pour finalement atteindre leur plus bas niveau après 18 heures où le nombre d'UFC récupérées se situe à environ 4% du nombre d'UFC récupéré lors du test standard.

***E. coli* 2787 envahit et survit à l'intérieur des cellules épithéliales Hep-2.** La moyenne du nombre d'UFC obtenu à la suite du test d'invasion avec la souche 2787 est nettement supérieure à celle obtenue pour l'invasion d'*E. coli* K-12 exprimant AIDA-I (environ 10X plus élevé; Figure 2). Le contrôle négatif démontre que les bactéries 2787 sont incapables de pénétrer à l'intérieur des cellules dont les remaniements d'actine sont bloqués et sont tuées par la gentamicine. Lorsque la souche *E. coli* 2787 pénètre les cellules, celle-ci semble capable de survivre à l'intérieur des cellules puisque le nombre d'UFC récupéré demeure relativement stable tout au long de la cinétique d'invasion. Cependant, cette observation peut être le résultat de deux phénomènes distincts : soit les bactéries envahissent les cellules épithéliales et demeurent à l'intérieur de celles-ci en état de latence ou soit la majorité des bactéries qui envahissent les cellules épithéliales meurent tandis que quelques bactéries réussissent à survivre et à se multiplier à l'intérieur des cellules épithéliales. Actuellement, il n'est pas possible de distinguer ces deux phénomènes. Une expérience de microscopie de fluorescence utilisant un colorant pour distinguer les bactéries vivantes et mortes (live/dead) lors d'une cinétique d'invasion de 2787 permettrait de discerner les deux phénomènes. De plus, il serait intéressant de déterminer quels sont les facteurs de virulence présents chez la souche sauvage 2787 qui lui permettent de survivre dans les cellules-hôtes.

CONCLUSION

L'adhésine AIDA-I permet l'invasion des cellules Hep-2 en culture. Cependant, l'incapacité de la souche de laboratoire exprimant AIDA-I à survivre à l'intérieur des cellules épithéliales Hep-2 démontre que la présence unique de l'AT AIDA-I ne permet pas à celle-ci de survivre à l'intérieur de la cellule. Contrairement à cette dernière, la survie de la souche sauvage 2787 à l'intérieur des cellules nous indique que cette dernière possède d'autres facteurs de virulence lui permettant de survivre à l'intérieur des cellules. Il n'est pas déterminé si ces dernières subissent un fort taux de mortalité suivi d'une croissance intracellulaire des survivantes ou si celles-ci entrent en dormance après l'invasion des cellules.

RÉFÉRENCES

1. **Anderson, B. E., G. A. McDonald, D. C. Jones, and R. L. Regnery.** 1990. A protective protein antigen of *Rickettsia rickettsii* has tandemly repeated, near-identical sequences. *Infect Immun* **58**:2760-9.
2. **Benz, I., and M. A. Schmidt.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**:1506-11.
3. **Charbonneau, M. E., F. Berthiaume, and M. Mourez.** 2006. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the *Escherichia coli* autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**:8504-12.
4. **Croxen, M. A., and B. B. Finlay.** Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* **8**:26-38.
5. **DebRoy, C., E. Roberts, W. Scheuchenzuber, S. Kariyawasam, and B. M. Jayarao.** 2009. Comparison of genotypes of *Escherichia coli* strains carrying F18ab and F18ac fimbriae from pigs. *J Vet Diagn Invest* **21**:359-64.
6. **Frydendahl, K.** 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* **85**:169-82.
7. **Ha, S. K., C. Choi, and C. Chae.** 2003. Prevalence of a gene encoding adhesin involved in diffuse adherence among *Escherichia coli* isolates in pigs with postweaning diarrhea or edema disease. *J Vet Diagn Invest* **15**:378-81.
8. **Ha, S. K., C. Choi, K. Jung, J. Kim, D. U. Han, Y. Ha, S. D. Lee, S. H. Kim, and C. Chae.** 2004. Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in *Escherichia coli* isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**:166-8.
9. **Han, W., B. Liu, B. Cao, L. Beutin, U. Kruger, H. Liu, Y. Li, Y. Liu, L. Feng, and L. Wang.** 2007. DNA microarray-based identification of serogroups and virulence gene patterns of *Escherichia coli* isolates associated with porcine postweaning diarrhea and edema disease. *Appl Environ Microbiol* **73**:4082-8.

10. **Helgerson, A. F., V. Sharma, A. M. Dow, R. Schroeder, K. Post, and N. A. Cornick.** 2006. Edema disease caused by a clone of *Escherichia coli* O147. *J Clin Microbiol* **44**:3074-7.
11. **Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, C. Rich, and B. Joly.** 1994. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol* **145**:621-32.
12. **Klemm, P., R. M. Vejborg, and O. Sherlock.** 2006. Self-associating autotransporters, SAATs: functional and structural similarities. *Int J Med Microbiol* **296**:187-95.
13. **Kline, K. A., S. Falker, S. Dahlberg, S. Normark, and B. Henriques-Normark.** 2009. Bacterial adhesins in host-microbe interactions. *Cell Host Microbe* **5**:580-92.
14. **Nabuurs, M. J., E. J. Van De Weijert, A. F. Grootendorst, and T. A. Niewold.** 2001. Oedema disease is associated with metabolic acidosis and small intestinal acidosis. *Res Vet Sci* **70**:247-53.
15. **Ngeleka, M., J. Pritchard, G. Appleyard, D. M. Middleton, and J. M. Fairbrother.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**:242-52.
16. **Niewerth, U., A. Frey, T. Voss, C. Le Bouguenec, G. Baljer, S. Franke, and M. A. Schmidt.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**:143-9.
17. **Pizarro-Cerda, J., and P. Cossart.** 2006. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* **124**:715-27.
18. **Ravi, M., M. Ngeleka, S. H. Kim, C. Gyles, F. Berthiaume, M. Mourez, D. Middleton, and E. Simko.** 2007. Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic *Escherichia coli* and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**:308-19.
19. **Russell, D. G.** 2005. Chapter 10 : Where to Stay inside the Cell: a Homesteader's Guide to Intracellular Parasitism

20. **Scaletsky, I. C., M. Z. Pedroso, M. B. Morais, R. L. Carvalho, R. M. Silva, S. H. Fabbicotti, and U. Fagundes-Neto.** 1999. [Association of patterns of *Escherichia coli* adherence to HEp-2 cells with acute and persistent diarrhea]. *Arq Gastroenterol* **36**:54-60.
21. **Stahl, C. H., T. R. Callaway, L. M. Lincoln, S. M. Lonergan, and K. J. Genovese.** 2004. Inhibitory activities of colicins against *Escherichia coli* strains responsible for postweaning diarrhea and edema disease in swine. *Antimicrob Agents Chemother* **48**:3119-21.
22. **Tsukahara, T., N. Nakanishi, K. Nakayama, N. Matsubara, and K. Ushida.** 2005. Experimental infection of enterotoxemic *Escherichia coli* associated with porcine edema disease and its pathologic characteristics in the intestine. *J Vet Med Sci* **67**:1167-71.
23. **Verdonck, F., P. Tiels, K. van Gog, B. M. Goddeeris, N. Lycke, J. Clements, and E. Cox.** 2007. Mucosal immunization of piglets with purified F18 fimbriae does not protect against F18+ *Escherichia coli* infection. *Vet Immunol Immunopathol* **120**:69-79.
24. **Zhang, W., M. Zhao, L. Ruesch, A. Omot, and D. Francis.** 2007. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**:145-52.
25. **Zhao, L., X. Chen, X. Xu, G. Song, and X. Liu.** 2009. Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in *Escherichia coli* isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *Vet J* **180**:124-9.

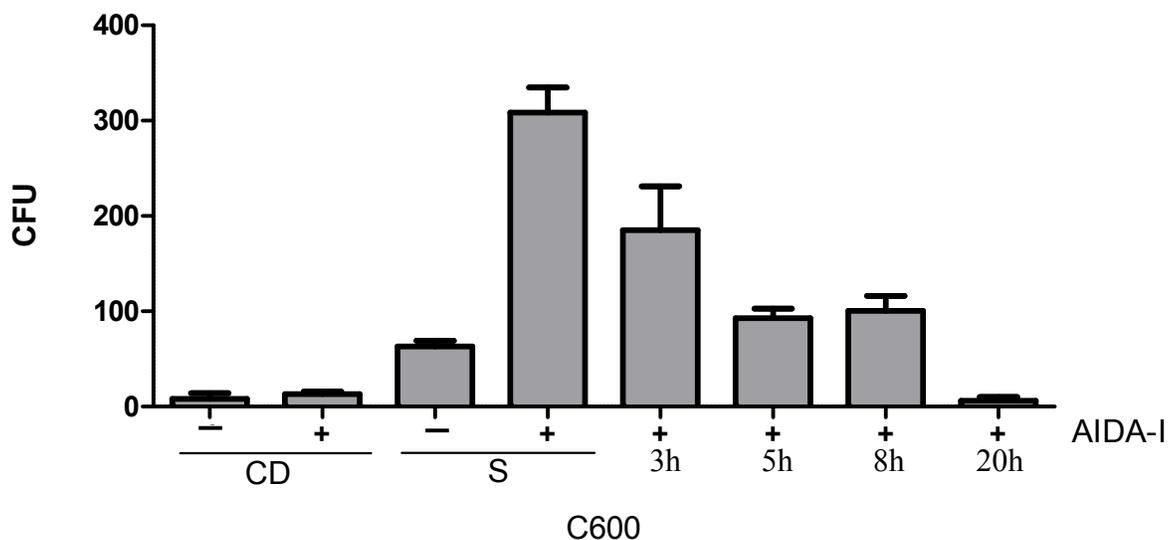


Figure 1. : Cinétique d'invasion et survie intracellulaire de la souche *E. coli* K-12 C600 exprimant AIDA-I.

La capacité d'invasion et de survie à l'intérieur des cellules Hep-2 des souches *E. coli* C600 exprimant ou non AIDA-I a été testée. Un contrôle négatif à la cytochalasine D (CD) a été effectué. Le test standard d'invasion (S) ainsi que des tests prolongés d'une heure (3h), de trois heures (5h), de six heures (8h) et de dix-huit heures (20h) ont été effectués.

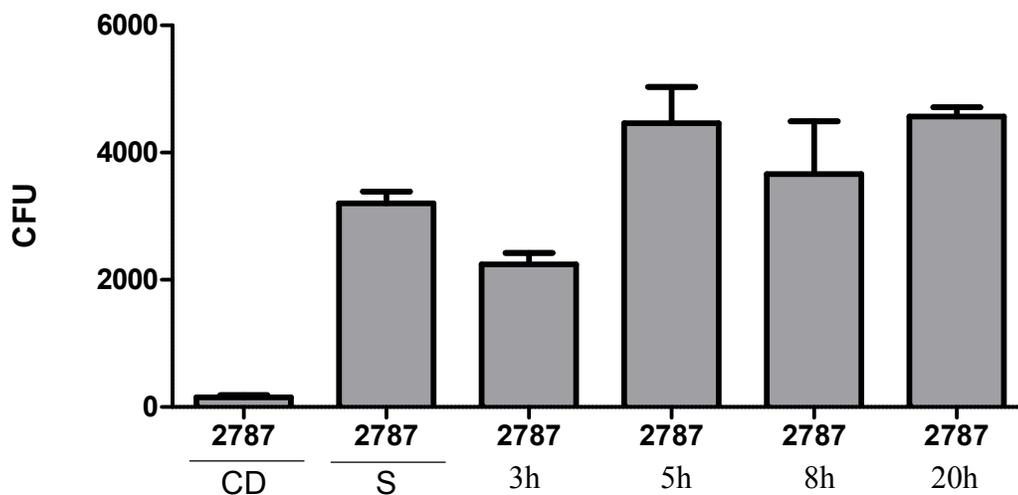


Figure 2. : Cinétique d'invasion et survie intracellulaire de la souche *E. coli* sauvage 2787 exprimant AIDA-I.

La capacité d'invasion et de survie à l'intérieur des cellules Hep-2 de la souche pathogène *E. coli* 2787 exprimant AIDA-I a été testée. Un contrôle négatif des cellules Hep-2 traitées à la cytochalasine D (CD) a été effectué. Le test standard d'invasion (S) ainsi que des tests prolongés d'une heure (3h), de trois heures (5h), de six heures (8h) et de dix-huit heures (20h) ont été effectués.

