

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

Ce document a été numérisé par la Division de la gestion des documents et des archives de l'Université de Montréal.

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

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

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

**NOTICE**

This document was digitized by the Records Management & Archives Division of Université de Montréal.

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

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

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

Université de Montréal

**Adhérence de souches d'*Escherichia coli*  
entéropathogènes O45 d'origine porcine aux cellules  
épithéliales intestinales porcines IPEC-J2.**

par

Brïte Pauchet

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures et postdoctorales

en vue de l'obtention du grade

Maître ès sciences (M.Sc.)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Janvier, 2009

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

Adhérence de souches d'*Escherichia coli* entéropathogènes O45 d'origine porcine  
aux cellules épithéliales intestinales porcines IPEC-J2.

présenté par :  
Brïte Pauchet

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Michaël Mourez, président-rapporteur  
John M. Fairbrother, directeur de recherche  
Éric Nadeau, co-directeur  
France Daigle, membre du jury



## Résumé

Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) sont une cause de diarrhée post-sevrage chez le porc. Ils possèdent le locus d'effacement des entérocytes et causent des lésions de type attachant-effaçant (A/E). Jusqu'à présent les souches d'origine porcine n'ont montré que peu d'adhérence sur les lignées cellulaires habituellement utilisées pour étudier les EPEC.

Le but de ce travail était tout d'abord de mettre au point un nouveau modèle permettant l'étude des EPEC O45 d'origine porcine, en utilisant une lignée cellulaire homologue, les cellules IPEC-J2, issues de l'intestin de porcelet nouveau-né, et ensuite d'étudier l'adhérence des souches d'origine porcine en relation avec leur profil de virulence.

Toutes les souches EPEC O45 d'origine porcine testées appartenaient aux groupes phylogénétiques B1 et B2, chacun étant composé de trois et de deux virotypes différents. Les souches du phylogroupe B1 possédaient les gènes de virulence *efal/lifA*, *paa* et *set/ent*, associés aux *E. coli* de type attachant et effaçant, et les gènes *fyuA*, *irp* et *tsh*, associés aux *E. coli* extra-intestinaux, alors que les souches du phylogroupe B2 possédaient les gènes *aid1*, *rtx* et *ECs1282*.

Toutes les souches adhéraient aux cellules IPEC-J2 et produisaient des lésions A/E dans ce modèle. Les souches du groupe B2 montraient une adhérence significativement plus importante à 4h et à 8h d'incubation que celles du groupe B1. Les EPEC O45 d'origine porcine adhéraient majoritairement selon deux patrons d'adhérence : l'adhérence diffuse et l'adhérence similaire à l'adhérence localisée. Trois souches présentaient de l'adhérence localisée en plus de ce dernier patron. L'adhérence diffuse était principalement associée aux souches du phylogroupe B2,

qui possèdent toutes *aidal*, le gène codant pour l'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse.

En conclusion cette étude nous a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs profils de virulence au sein des souches EPEC O45 d'origine porcine, et de démontrer que l'adhésion de ces souches varie en fonction du groupe phylogénétique. Elle a également permis la mise au point d'un modèle valide pour l'étude de l'adhérence des souches EPEC d'origine porcine et du rôle de leurs facteurs de virulence dans cette adhérence.

**Mots-clés :** *Escherichia coli* entéropathogènes, adhérence, lignée IPEC-J2, groupe phylogénétique, facteurs de virulence

## Abstract

Porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) cause post-weaning diarrhea in pigs. They possess the locus of enterocyte effacement (LEE) and cause typical attaching and effacing (A/E) lesions. To date, porcine EPEC did not demonstrate any adherence to the cell lines commonly used to study EPEC.

The aim of the present work was to further study the initial adherence of porcine EPEC in the porcine intestinal cell line IPEC-J2, in relation to their virulence gene profile.

Porcine O45 EPEC belong to the phylogenetic groups B1 and B2, consisting of three and two different virotypes, respectively. All strains of phylogroup B1 possess the attaching and effacing *E. coli* (AEEC) associated virulence genes *efal/lifA*, *paa* and *set/ent*, and the extra-intestinal *E. coli* associated virulence genes *fyuA*, *irp* and *tsh*, whereas strains of phylogroup B2 possess the AEEC gene *aida1* and the genes *rtx* and *ECs1282* of unknown function. All porcine EPEC possess the LEE genes *eae-β* and *tir-1* and demonstrated adherence and A/E lesions in the IPEC-J2 cell line. Strains of phylogroup B2 adhered to a significantly greater proportion of cells at 4h and 8h of incubation than strains of phylogroup B1. Porcine O45 EPEC strains demonstrated mainly the localized adherence-like and the diffuse adherence patterns, while three strains displayed the localized adherence pattern. The diffuse adherence pattern was mainly associated with the *aida*-positive phylogroup B2.

In conclusion, we demonstrated the presence of different virulence profiles in porcine O45 EPEC and the suitability of the IPEC-J2 cell line to study the adherence of porcine EPEC and the role of different virulence factors in this adherence.

**Keywords :** enteropathogenic *E. coli*, adherence, IPEC-J2 cell line, phylogenetic group, virulence profile

## Table des matières

Résumé.....	iii
Table des matières .....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	x
Liste des sigles et abréviations.....	xi
Remerciements.....	xvi
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	3
1. Les <i>Escherichia coli</i> .....	4
1.1. Généralités .....	4
1.2. Subdivision des <i>E. coli</i> pathogènes.....	4
2. Les <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes.....	7
2.1. Les EPEC chez le porc.....	7
2.2. Les EPEC chez l'homme .....	9
3. Interaction avec l'hôte .....	10
3.1. Adhérence initiale .....	10
3.1.1. Généralités .....	10
3.1.2. Adhésines présentes chez les EPEC .....	11
3.1.2.1. Les fimbriae .....	11
3.1.2.2. Le flagelle .....	13
3.1.2.3. AIDA .....	14
3.1.2.4. La lymphostatine.....	14
3.1.2.5. PAA .....	14
3.2. Adhérence intime et lésions de type attachant et effaçant .....	15
3.2.1. Expression du système de sécrétion de type III.....	18



3.2.2. Adhérence intime .....	20
3.3. Internalisation .....	23
3.4. Induction de la diarrhée .....	24
4. Modèles pour étudier les EPEC .....	25
4.1. Les modèles <i>in vivo</i> et <i>ex vivo</i> .....	25
4.1.1. Les études <i>in vivo</i> .....	25
4.1.2. La culture d'organe <i>in vitro</i> .....	25
4.2. La culture cellulaire .....	26
Matériel, méthodes et résultats .....	29
Discussion .....	66
Conclusion .....	78
Bibliographie .....	I
Annexe .....	XXIV

## Liste des tableaux

Tableau I : Facteurs de virulence retrouvés chez les EPEC. ....	17
Tableau II : Suivi de l'évolution des lésions A/E sur IVOC d'intestin de porcelet au cours du temps par microscopie optique.....	69

**Article : Porcine O45 enteropathogenic *Escherichia coli* belong to two phylogenetic groups with unique virulence factor profiles and *in vitro* adherence properties**

Table 1: Porcine O45 EPEC strains used in this study.....	58
Table 2: Distribution of additional virulence genes in virotypes and phylogenetic groups of porcine EPEC O45 strains.....	60

## Liste des figures

Figure 1 : Pathogenèse des infections aux EPEC .....	15
Figure 2 : Système de sécrétion de type III. ....	19
Figure 3 : Interaction de Tir avec les protéines du cytosquelette .....	22
Figure 4 : Lésions de type attachant-effaçant. ....	23
Figure 5 : Patrons d'adhérence présentés par les <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux sur la lignée HEP-2.....	27

**Article : Porcine O45 enteropathogenic *Escherichia coli* belong to two  
phylogenetic groups with unique virulence factor profiles and *in vitro* adherence  
properties**

Figure 1: Adherence of porcine EPEC strains to IPEC-J2 cells.....	61
Figure 2: Adherence patterns after 4h of incubation for porcine EPEC O45 strains on IPEC-J2 cells.....	62
Figure 3: Representative micrographs of attaching and effacing lesions caused by O45 porcine EPEC strains on IPEC-J2 cells.....	63
Figure 4: Difference in the adhesion of strains belonging to the two phylogroups.....	64

## Liste des sigles et abréviations

AA	Adhérence agrégative / <i>Aggregative adherence</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
AEEC	<i>Escherichia coli</i> de type attachant-effaçant
APEC	<i>Escherichia coli</i> pathogènes aviaires
BFP	<i>Bundle forming pilus</i>
Caco-2	Lignée cellulaire épithéliale d'origine humaine, isolée d'un adénocarcinome colorectal
DA	Adhérence diffuse / <i>Diffuse adherence</i>
DAEC	<i>Escherichia coli</i> à adhérence diffuse
EAEC	<i>Escherichia coli</i> entéro-agrégatifs
EAF	<i>EPEC adherence factor</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> entéro-invasifs
EPEC	<i>Escherichia coli</i> entéro-pathogènes
ETEC	<i>Escherichia coli</i> entérotoxinogènes
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extra-intestinaux
FAS test	Test de coloration de l'actine fluorescente / <i>Fluorescent Actin Staining test</i>
HeLa	Lignée cellulaire épithéliale d'origine humaine, isolée d'un adénocarcinome du col de l'utérus
HEp-2	Lignée cellulaire épithéliale d'origine humaine, isolée d'un carcinome épidermoïde du larynx et contaminée par la lignée HeLa
IPEC-J2	Lignée cellulaire épithéliale d'origine porcine, isolée du jéjunum
IVOC	Culture d'organe <i>in vitro</i> / <i>In vitro Organ Culture</i>
LA	Adhérence localisée / <i>Localized adherence</i>
LAL	Adhérence similaire à l'adhérence localisée / <i>Localized adherence-like</i>
LEE	Locus d'effacement des entérocytes / <i>Locus of enterocytes</i>

	<i>effacement</i>
Lésions A/E	Lésions de type attachant-effaçant
LPF	<i>Long polar fimbriae</i>
LPS	Lipopolysaccharide
ORF	Cadre ouvert de lecture / <i>Open reading frame</i>
PCR	Amplification itérative / <i>Polymerase chain reaction</i>
SSTT	Système de sécrétion de type III
STEC	<i>Escherichia coli</i> shiga-toxinogènes, aussi appelés <i>E. coli</i> vérotoxinogènes
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropathogènes

*Horum omnium fortissimi sunt Belgae...*

*(Caius Iulius Caesar)*

**Et plus prosaïquement...**

*Dans le cochon, tout est bon.*

Lettre d'amour (gisante)

Texte présenté le 13 février 2009 au Presse-Café de Mont-Saint-Hilaire  
Lors de la soirée Slam et Poésie des « Mots dits Vers »

*Escherichia*

Comme il m'est difficile de ne pas penser à toi  
Soleil de mes jours, Astre de mes nuits  
Pas une minute ne se passe sans que je rêve de toi

*Escherichia, Escherichia*

Ton nom imprononçable me remplit de joie  
Chacune de tes cellules s'insinue en moi  
*Escherichia*

*Escherichia, Escherichia*

Combien de jours, combien de nuits m'as-tu hantée sans le savoir ?  
Je garde ton image gravée au plus profond de ma mémoire

*Escherichia*

Les yeux vissés dans le microscope, je ne voyais que toi !  
Des cellules, et toi  
Les bactéries, c'était toi  
*Escherichia*

*Escherichia*

Bien vite j'ai découvert ton vrai visage  
Les heures passées à ton chevet m'ont épuisée  
J'ai dû puiser jusqu'aux tréfonds de mon âme la force de continuer.

Et pourtant, je sais !  
que je ne te vaincrai pas,  
que nul ne te vaincra,  
jamais !

La force qui m'anime de te disséquer,  
de t'observer sous tous les angles,  
de comprendre ta vraie nature,  
me minera, bien avant l'heure.

Bientôt, je me servirai de mon corps comme ultime cobaye,  
m'injectant ton être pour que nous puissions être encore plus proche.  
Fusion des genres : Bactérie pathogène pataugeant dans mon propre sang.

Mais je sais, hélas  
que bien vite tu t'y sentiras à l'aise  
que tu t'y développeras à l'envi  
que tu t'y multiplieras à l'excès  
jusqu'à me ronger les entrailles.

Traversant barrières et muqueuses, tu chercheras ta niche  
Tu fomenteras des querelles intestines au cœur de mes organes  
Tu useras mes cellules jusqu'à la lie,  
Te drapant de leurs membranes,  
Caracolant sur leurs cytosquelettes,  
Te gavant de leurs noyaux.

La nécrose guette  
La gangrène se profile  
L'intoxication est là.  
Mes méninges nagent dans une bouillie informe de sucres pestilentiels,  
Larmes de sang, rivières de pus, cirrhose septicémique.

La puanteur s'exhale de tous mes pores.

!!! Putréfaction !!!

Je ne suis plus qu'un cadavre  
dans lequel tu prolifères encore et toujours.

Il n'y aura donc pas de fin !



## Remerciements

Merci à tous ceux qui liront ce texte.

Un grand merci à John M. Fairbrother, mon directeur de recherche et à Éric Nadeau, mon codirecteur, pour l'incroyable accueil que j'ai eu au laboratoire, pour tous les travaux qu'ils m'ont permis de mener à bien et pour les discussions diverses et variées que nous avons pu avoir au cours de ces trois années.

Merci à tous les membres du laboratoire, Annette, Brigitte, Clarisse, Jacinthe, Jade, Lisette, Louise.

Merci à Benjamin et Maurice, mes deux « compagnons d'infortune ».

Merci à tous les membres et étudiants du GREMIP pour le soutien qu'ils ont pu m'apporter.

## Introduction

Les infections intestinales sont une des principales causes de pertes économiques dans l'industrie porcine. La période suivant le sevrage est l'une des périodes les plus à risque chez le porc. Plusieurs pathotypes d'*Escherichia coli* peuvent provoquer de la diarrhée. Parmi eux, les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont impliqués dans 10% des cas de diarrhée dans la période suivant le sevrage. Ces pathogènes causent des lésions de type « attachant-effaçant » (A/E) à la surface apicale des cellules épithéliales intestinales avec, pour conséquence, de la diarrhée. Chez le porc, les EPEC sont considérés comme des pathogènes opportunistes. En effet, plusieurs études rapportent un portage asymptomatique variant de 10 à 89%. L'incidence et l'importance des infections aux EPEC chez le porc restent cependant méconnues. De plus, diverses études ont suggéré que le déclenchement de la maladie surviendrait lors d'un affaiblissement du système immunitaire.

Au Québec, les souches de séro groupe O45 sont isolés chez 3,4% des cas cliniques de diarrhée post-sevrage due aux EPEC. C'est la raison pour laquelle ils ont fait l'objet de différentes études portant sur le développement des lésions A/E et sur la réponse immunitaire associée chez le porc. L'analyse des profils de facteurs de virulence d'une collection de souches EPEC O45 isolées de cas cliniques de diarrhée post-sevrage entre 1983 et 2004 au Québec a démontré une évolution des virotypes au cours de la période d'échantillonnage. L'origine de la variabilité au sein de ces souches et son influence sur la pathogénèse restent inconnues.

Jusqu'à présent, les modèles d'étude des EPEC d'origine porcine sont principalement les modèles *in vivo* et la culture d'organe *in vitro*. Ces modèles sont relativement lourds et nécessitent le sacrifice d'un animal. En comparaison, la culture cellulaire permet un contrôle plus aisé des différentes conditions nécessaires à l'étude du rôle des facteurs bactériens dans la virulence. Classiquement, les EPEC d'origine

humaine sont étudiés sur des lignées épithéliales d'origine humaine, comme les cellules HeLa et HEP-2. Cependant les EPEC d'origine porcine ne démontrent aucune adhérence sur ces lignées. Une nouvelle lignée intestinale d'origine porcine, la lignée cellulaire IPEC-J2, a été établie récemment.

L'objectif de ce projet était, premièrement, de mettre au point un modèle de culture cellulaire homologue pour l'étude de la relation hôte-pathogène des souches EPEC O45 d'origine porcine et, deuxièmement, de comparer les propriétés d'adhérence et le développement des lésions A/E générées par les souches des différents virotypes dans la lignée cellulaire IPEC-J2.

## **Recension de la littérature**

# **1. Les *Escherichia coli***

## **1.1. Généralités**

Les *Escherichia coli* sont des bacilles à coloration de Gram négative appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae*. La majorité d'entre eux fait partie de la flore commensale du tractus digestif des mammifères et des oiseaux et ne cause aucune pathologie. Ils colonisent le tractus intestinal des nouveaux-nés dans les premières heures de la vie et constituent la principale flore anaérobie facultative du côlon (Bettelheim, 1994; Gyles et Fairbrother, 2004). Cependant, certains *E. coli* sont pathogènes, pouvant entraîner diarrhée, gastroentérite, infection du tractus urinaire, méningite ou septicémie (Gyles et Fairbrother, 2004; Kaper et al., 2004). Pour ce faire, ils ont acquis au cours de l'évolution différents facteurs de virulence leur permettant de s'adapter à de nouvelles niches et de causer des lésions (Gyles et Fairbrother, 2004).

## **1.2. Subdivision des *E. coli* pathogènes**

Il existe différentes méthodes pour classer les *E. coli*, par le phénotype (aspect des colonies, croissance en milieu sélectif, tests biochimiques, antibiorésistance, sérologie) ou par le génotype (virotype, pulsotype) (Riley, 2004b).

La façon la plus simple est basée sur la pathologie induite. Les *E. coli* sont regroupés en plusieurs pathotypes, chacun correspondant à un groupe de souches, qui causent une même maladie en utilisant un même assortiment de gènes de virulence (Kaper et al., 2004). Les différents pathotypes sont : *E. coli* entéro-pathogènes (EPEC), *E. coli* shiga-toxinogènes (STEC), *E. coli* entérotoxinogènes (ETEC), *E. coli* entéro-invasifs (EIEC), *E. coli* entéro-agrégatifs (EAEC), *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et *E. coli* extra-intestinaux (ExPEC), comprenant entre autres les *E. coli* uropathogènes (UPEC) et les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) (Gyles et Fairbrother, 2004; Kaper et al., 2004).

Une méthode plus ancienne, le sérotypage, se base sur la présence des antigènes bactériens particuliers : l'antigène somatique (antigène O), l'antigène flagellaire (antigène H) et l'antigène capsulaire (antigène K). La spécificité de l'antigène O est déterminée par la séquence des chaînes polysaccharidiques du lipopolysaccharide (LPS) (Orskov et Orskov, 1992). Jusqu'à présent, 185 antigènes O différents et 56 antigènes H ont été identifiés (Blanco et al., 2004; Nicolas-Chanoine et al., 2008).

Par exemple, les EPEC d'origine humaine appartiennent principalement aux sérogroupes O55, O86, O111, O119, O125, O126, O127, O128ab et O142 (Chen et Frankel, 2005) alors que les EPEC d'origine porcine appartiennent généralement aux sérogroupes O45, O103 et O108 (Gyles et Fairbrother, 2004; Malik et al., 2006).

Ces classifications ne prennent pas en compte l'évolution phylogénétique des souches. Les *E. coli*, pathogènes comme commensaux, sont très hétérogènes du point de vue de leur contenu génétique. Ils ont évolué par mutation et recombinaison et ont acquis des gènes de virulence par transfert horizontal (Boerlin, 2004; Jores et al., 2004). Pour établir les relations évolutives entre les souches, il est donc également intéressant d'étudier la variation génétique.

L'électrophorèse enzymatique multilocus a permis de répartir les *E. coli* de la collection de référence ECOR en 4 groupes phylogénétiques : les groupes A, B1, B2 et D (Jores et al., 2004; Ochman et Selander, 1984). La distribution phylogénétique des lignées est déterminée grâce aux variations alléliques existant dans certaines enzymes métaboliques, ce qui entraîne une variation dans les patrons de mobilité électrophorétique (Riley, 2004b). Par exemple, chez les ExPEC, les souches pathogènes sont plus associées aux groupes B2 et D, alors que les souches commensales sont plus fréquentes dans les groupes A et B1. De plus, certains facteurs de virulence sont présents principalement dans les souches des groupes B2 et D alors que d'autres le sont dans les quatre groupes (Picard et al., 1999; Riley, 2004a). Récemment, Clermont et collaborateurs ont mis au point une clef de détermination permettant de classer les *E. coli* dans les quatre phylogroupes, sur base

de la présence ou de l'absence des gènes *chuA*, *yjaA* et *tspE4.C2* (Clermont et al., 2000).

Le typage des séquences à locus multiples est basé sur la présence de différences alléliques au sein de plusieurs gènes de ménage. Cette méthode mesure les variations de séquence d'ADN dans une série de gènes de ménage et caractérise les souches bactériennes par leur profil allélique unique (Riley, 2004b). La comparaison des profils alléliques détermine la parenté entre les souches.

Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction et l'électrophorèse en champ pulsé utilisent, quant à elles, les variations alléliques présentes à des sites de restriction (Riley, 2004b). Le matériel génétique des souches est soumis à un traitement par certaines enzymes de restriction, qui reconnaissent et coupent l'ADN à des sites spécifiques. La comparaison des profils de migration détermine la parenté entre les souches.

Le virotypage est la caractérisation des souches par un ensemble de gènes de virulence. Il est généralement établi par PCR ou hybridation sur colonies. La technologie de puce à ADN permet de comparer des pans plus importants du génome et de comparer les profils de facteurs de virulence présents dans les souches bactériennes (Riley, 2004b).

Il ne faut cependant pas perdre de vue qu'un même pathotype peut être représenté dans différents groupes phylogénétiques. Cela souligne la complexité des mécanismes d'acquisition des gènes : les facteurs de virulence définissant le pathotype pouvaient être présents chez un ancêtre commun, ou ont pu être acquis à des moments différents par les différentes lignées, ou encore être échangés entre les lignées (Jores et al., 2004). Pour exemple, chez les EPEC, les principaux facteurs de virulence sont localisés sur des îlots de pathogénicité comme le locus d'effacement des entérocytes (LEE). La distribution des facteurs de virulence des EPEC ne suit pas l'évolution phylogénétique des souches, ce qui indique que ces facteurs de virulence

ont été introduits séparément et de façon répétée dans le génome des différentes lignées (Boerlin, 2004).

Les *E. coli* sont responsables de toute une série de maladies chez les animaux. Chez le porc, les pathotypes les plus fréquemment rencontrés sont les ETEC, cause de diarrhée néonatale et du syndrome de diarrhée apparaissant dans la période suivant le sevrage, ci-après appelée « diarrhée post-sevrage », les STEC, agents de la maladie de l'œdème, les EPEC, cause de diarrhée post-sevrage et les ExPEC qui peuvent provoquer de la septicémie et des infections du tractus urogénital (Gyles et Fairbrother, 2004).

## **2. Les *Escherichia coli* entéropathogènes**

Les EPEC sont isolés de cas de diarrhée chez diverses espèces de mammifères : bovins, petits ruminants, porc, chien, lapin, cheval et chez certains oiseaux (Aktan et al., 2004; An et al., 1997; China et al., 1998; Krause et al., 2005; Wales et al., 2005; Zhu et al., 1994). Chez la souris, une autre espèce bactérienne cause une pathologie similaire associée à la présence de lésions de type attachant-effaçant (A/E) : *Citrobacter rodentium* (Mundy et al., 2005).

### **2.1. Les EPEC chez le porc**

Chez le porc, les EPEC touchent les porcelets lors de la période suivant le sevrage. Ils occasionnent de la diarrhée (Janke et al., 1989; Neef et al., 1994; Wada et al., 1996) pouvant se révéler hémorragique (Wales et al., 2005). En diagnostic, la recherche des EPEC se fait généralement par test PCR sur le gène *eae*, codant pour l'intimine, l'adhésine spécifique des EPEC et des autres microorganismes induisant des lésions A/E. Selon les pays, les EPEC sont isolés chez 3 à 25% des porcelets diarrhéiques (Hélie et al., 1991; Malik et al., 2006; Martins et al., 2000; Moon et al., 1999; Ngeleka et al., 2003; Osek, 2001; Vu-Khac et al., 2007) mais aussi chez 10 à 89% des porcelets sains (Frohlicher et al., 2008; Krause et al., 2005; Malik et al., 2006; Martins et al., 2000; Ngeleka et al., 2003; Vu-Khac et al., 2007). Ils sont



également isolés chez des animaux plus jeunes, en association ou non avec d'autres pathogènes (Higgins et al., 1997; Janke et al., 1989; Wada et al., 1996). Cependant, ils restent généralement minoritaires au sein des *E. coli* de la flore intestinale, que ce soit chez les porcelets sains ou chez les porcelets diarrhéiques (Malik et al., 2006).

Il est à noter que les souches isolées de porcelets sains sont aussi capables de provoquer de la diarrhée (Ngeleka et al., 2003). Les EPEC constituent donc une flore pathogène opportuniste, qui profite, pour déclencher la maladie, d'une immunité déficiente (Girard et al., 2005b) ou de conditions environnementales défavorables (Neef et al., 1994).

Chez le porc, les sérogroupes les plus fréquemment associés à la diarrhée post-sevrage sont les sérogroupes O26, O45, O49, O75, O103, O108, O116 et O123 (Fairbrother et Nadeau, 2008; Hélie et al., 1991; Malik et al., 2006; Zhu et al., 1994) et les sous-types les plus communs de l'intimine sont l'intimine bêta et l'intimine thêta (Aktan et al., 2004; Krause et al., 2005; Malik et al., 2006; Vu-Khac et al., 2007).

Tout comme chez les autres espèces animales, les EPEC causent chez le porc des lésions A/E, principalement au niveau de l'intestin grêle et du côlon (Staley et al., 1969; Wales et al., 2005; Zhu et al., 1994). Selon les études, les signes cliniques sont plus ou moins importants, les porcelets peuvent être asymptomatiques, présenter des retards de croissance et/ou souffrir de diarrhée (Neef et al., 1994; Staley et al., 1969). De la même façon, l'étendue des lésions et la colonisation bactérienne sont variables (Gyles et Fairbrother, 2004). Les lésions peuvent être dispersées et limitées à l'intestin grêle et au côlon ou se montrer très sévères et envahir le caecum (Gyles et Fairbrother, 2004; Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994). De la desquamation des entérocytes et quelques ulcérations peuvent être observées, ainsi qu'une légère atrophie des villosités de l'intestin grêle (Gyles et Fairbrother, 2004; Neef et al., 1994; Staley et al., 1969). Les EPEC colonisent les entérocytes des villosités et envahissent rarement les cryptes (Staley et al., 1969). Les bactéries sont souvent organisées en palissade à la surface de l'épithélium (Gyles et Fairbrother, 2004).

Certaines souches d'origine porcine s'internalisent dans les entérocytes. Ces lésions sont visibles 48 h après inoculation (Hélie et al., 1991; Staley et al., 1969). L'infiltration de la *lamina propria* par les neutrophiles est légère à modérée (Gyles et Fairbrother, 2004; Neef et al., 1994; Staley et al., 1969; Zhu et al., 1994).

## 2.2. Les EPEC chez l'homme

Les EPEC sont aussi largement étudiées chez l'homme, parce qu'ils sont la principale cause de diarrhée infantile dans les pays en voie de développement et qu'ils entraînent la mort de plusieurs centaines de milliers d'enfants par année (Chen et Frankel, 2005). Présents dans l'environnement, ils touchent principalement les populations pauvres, qui n'ont accès ni à l'eau potable ni au système d'égouts (Fagundes-Neto et Scaletsky, 2000). Les EPEC causent une intense diarrhée sécrétoire entraînant une importante perte de fluides et d'électrolytes dans les matières fécales. Ils peuvent aussi causer de la fièvre, des nausées et du vomissement (Chen et Frankel, 2005; Fagundes-Neto et Scaletsky, 2000). Ces symptômes sont parfois suivis d'une sévère malabsorption des nutriments et d'une intolérance alimentaire qui aggravent le déficit nutritionnel des nourrissons et permettent la persistance de la diarrhée. Les EPEC sont donc associés autant à des épisodes de diarrhée aiguë qu'à des épisodes de diarrhée persistante. Le traitement des infections aux EPEC est un traitement symptomatique : lutte contre la déshydratation et la perte d'électrolytes et lutte contre la perte de poids (Fagundes-Neto et Scaletsky, 2000).

Les EPEC d'origine humaine sont divisées entre les souches « typiques » qui détiennent le plasmide EAF (pour *EPEC adherence factor*) et les souches « atypiques » qui ne l'ont pas. Les EPEC typiques présentent un patron d'adhérence particulier, l'adhérence localisée (LA) (Chen et Frankel, 2005; Kaper et al., 2004).

Jusqu'à récemment, les EPEC atypiques étaient considérées comme peu à pas pathogènes. Cependant, de plus en plus d'études récentes rapportent leur implication dans des cas de diarrhée, que ce soit dans les pays industrialisés (Afset et al., 2006; Scotland et al., 1996) ou dans les pays en voie de développement (Hernandes et al.,

2006; Trabulsi et al., 2002). Ces souches sont également présentes chez 5 à 10% des enfants sains (Beutin et al., 2003; Dulguer et al., 2003). Jusqu'à présent, il n'y a aucune preuve que les souches atypiques d'origine humaine soient moins pathogènes que les souches typiques (Trabulsi et al., 2002). Plus de 98% des souches EPEC isolées chez diverses espèces domestiques sont des EPEC atypiques, les souches typiques ne se retrouvant que chez le chien et le chat (Krause et al., 2005). Les EPEC atypiques appartenant à certains sérotypes associés à la diarrhée chez l'homme ont aussi été isolées chez le veau, le lapin, le chien et le singe (Trabulsi et al., 2002).

Les EPEC typiques sont relativement homogènes, que ce soit par leurs sérotypes ou leur virotype (gènes du LEE, facteur EAF) et leur patron d'adhérence. À l'inverse, les patrons d'adhérence, les sérogroupes, les facteurs de virulence, ainsi que les groupes phylogénétiques sont très diversifiés chez les EPEC atypiques (Afset et al., 2008; Beutin et al., 2003; Dulguer et al., 2003; Trabulsi et al., 2002).

### **3. Interaction avec l'hôte**

#### **3.1. Adhérence initiale**

##### **3.1.1. Généralités**

Avant de provoquer une maladie, les pathogènes doivent entrer dans l'organisme hôte, atteindre leur site de colonisation et s'y fixer. Là, ils doivent éviter les défenses de l'hôte et se multiplier jusqu'à atteindre un nombre suffisant pour coloniser d'autres sites. Pour perdurer, ils doivent aussi se disséminer vers d'autres hôtes sensibles, que ce soit par une contamination directe ou via l'environnement (Gyles et Prescott, 2004).

Ensuite, l'étape critique est l'adhésion aux cellules hôtes ou aux protéines de la matrice extracellulaire (Gyles et Prescott, 2004; Le Bouguéneq, 2005). Au niveau du tractus gastro-intestinal, les bactéries doivent dépasser les défenses non spécifiques que sont l'acidité stomacale, le mucus, les peptides antimicrobiens, le péristaltisme, la

desquamation et la flore commensale résidente. L'adhésion bactérienne nécessite donc des interactions fortes et hautement spécifiques entre des ligands présents à la surface des bactéries et des récepteurs sur la cellule hôte (Nougayrède et al., 2003).

Les facteurs d'adhérence regroupent des molécules qui se lient directement à un récepteur de l'hôte, mais aussi divers facteurs régulateurs et accessoires qui contribuent indirectement à l'adhésion. Les adhésines sont des protéines bactériennes qui se lient à des récepteurs présents à la surface de la cellule hôte (par exemple, les *fimbriae* ou l'intimine) (Nougayrède et al., 2003). Comme elles sont spécifiques d'un récepteur, les adhésines déterminent la spécificité d'espèce, d'âge et de tissu (Gyles et Prescott, 2004). En plus de leur rôle d'adhésion à la muqueuse, les adhésines d'*E. coli* et leurs récepteurs cellulaires agissent dans les étapes subséquentes du processus infectieux, comme la formation de réservoir intracellulaire, l'induction de cascades de signalisation et l'induction de la réponse immune (Le Bouguéneq, 2005).

### **3.1.2. Adhésines présentes chez les EPEC**

#### **3.1.2.1. Les *fimbriae***

Les *fimbriae*, ou *pili*, sont des structures tubulaires présentes à la surface des *E. coli*. Ce sont les médiateurs de l'adhésion entre les bactéries et les cellules hôtes (Nougayrède et al., 2003). Généralement, les *fimbriae* sont constitués d'une centaine de copies de la sous-unité majeure, qui donne la structure et confère la spécificité antigénique du *fimbriae*. Ils contiennent aussi un certain nombre de copies des sous-unités mineures, l'une d'entre elles étant l'adhésine, qui a des propriétés de liaison spécifiques (Gyles et Fairbrother, 2004). Ils sont habituellement observables en microscopie électronique : ils sont plus fins, plus courts et plus nombreux que les flagelles (Le Bouguéneq, 2005).

Les *pili* de type I sont présents à la surface des *E. coli* commensaux aussi bien que pathogènes et sont responsables de l'hémagglutination sensible au mannose (Kuehn et al., 1992; Le Bouguéneq, 2005). Ils sont codés sur un opéron de 8 gènes, l'opéron *fim* (Tableau I) (Le Bouguéneq, 2005). L'adhésine, FimH, est située à l'extrémité de la fibrille et est responsable de l'affinité pour le récepteur cellulaire (Le Bouguéneq, 2005). Elle a un domaine analogue aux intégrines, qui peut être la base de ses propriétés adhésives (Tchesnokova et al., 2008). Chez les UPEC, FimH est impliqué dans l'adhésion, l'invasion et la formation du biofilm (Le Bouguéneq, 2005). De plus, la liaison de FimH au *Toll-Like Receptor 4* serait responsable du déclenchement de la réponse inflammatoire lors des infections du tractus urinaire (Mossman et al., 2008). De même, chez l'homme, les *pili* de type I initieraient la réponse inflammatoire suite à l'infection par les EPEC (Nougayrède et al., 2003).

Le long polar *fimbriae* (LPF, Tableau I) a été découvert chez les souches de *Salmonella typhimurium*. Il est codé par un opéron de cinq gènes, homologue à l'opéron *fim* (Bäumler et Heffron, 1995). Chez la souris, le LPF participe à l'adhérence des salmonelles aux follicules lymphoïdes des plaques de Peyer (Bäumler et al., 1996). Le gène *lpfA* code pour la sous-unité majeure du *fimbriae*. Quatre variants de *lpfA* sont répertoriés chez les STEC : *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub>, *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub>, *lpfA*<sub>O113</sub> et *lpfA*<sub>O26</sub> (Doughty et al., 2002; Newton et al., 2004; Torres et al., 2002; Torres et al., 2004). Ils sont également présents chez les EPEC et d'autres pathotypes d'*E. coli* (Toma et al., 2006). Tout comme chez *Salmonella*, le LPF pourrait influencer le tropisme tissulaire des STEC O157:H7 (Fitzhenry et al., 2006). Le rôle des différents variants dans l'adhérence diffère. Les variants *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub> et *lpfA*<sub>O113</sub> ont tous deux été impliqués dans l'adhérence, contrairement au variant *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub> (Doughty et al., 2002; Torres et al., 2002; Torres et al., 2004). De plus, le variant *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub> contribuerait à la formation des microcolonies et à la colonisation intestinale chez le porc et le mouton (Jordan et al., 2004; Torres et al., 2002). Enfin, les variants

*lpfA*<sub>O157/O1-141</sub> et *lpfA*<sub>O157/O1-154</sub> sont plus particulièrement associés aux séropathotypes les plus virulents des STEC (Toma et al., 2004).

Les EPEC typiques d'origine humaine possèdent le facteur EAF. Ce plasmide renferme l'opéron *bfp*, qui code pour un *fimbriae* de type IV, le *bundle forming pilus* (BFP) (Nataro et Kaper, 1998). Le BFP est requis pour la formation de microcolonies tridimensionnelles complexes par des interactions inter-bactériennes. Il n'est exprimé que dans des conditions de culture particulières et n'est pas nécessaire à la formation des lésions A/E (Chen et Frankel, 2005; Nataro et Kaper, 1998). Des études récentes suggèrent que la phosphatidyl-éthanolamine ou la N-acétyl-lactosamine pourraient lui servir de récepteurs sur la cellule hôte (Hyland et al., 2008; Khursigara et al., 2001). Cependant, bien qu'il soit clairement impliqué dans l'adhérence entre les bactéries, son rôle dans l'adhérence aux cellules épithéliales reste un sujet à controverse (Chen et Frankel, 2005; Tobe et Sasakawa, 2001). Chez les EPEC typiques, le BFP participerait, conjointement avec le filament EspA (voir section 3.2.1), à l'adhérence initiale aux cellules épithéliales, alors que chez les souches atypiques, seul le filament EspA jouerait ce rôle (Cleary et al., 2004). Il serait, toujours avec EspA, également impliqué dans la formation du biofilm (Moreira et al., 2006).

Un autre facteur récemment découvert est le « *E. coli common pilus* ». Ce pilus est présent chez les *E. coli* pathogènes et commensaux et interviendrait dans l'adhérence des EPEC et des STEC O157:H7 (Rendon et al., 2007; Saldana et al., 2009).

### 3.1.2.2. Le flagelle

Récemment, les flagelles ont été impliqués dans l'adhérence des EPEC aux cellules épithéliales. Des souches mutantes pour le gène *fliC* (Tableau I) sont déficientes dans leurs propriétés d'adhérence et de formation de microcolonies (Chen

et Frankel, 2005; Giron et al., 2002). Il y aurait aussi une influence de l'expression du flagelle sur le BFP et inversement (Giron et al., 2002).

### 3.1.2.3.AIDA

L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse (AIDA) est une protéine autotransporteur de la membrane externe. Elle permet l'adhérence des bactéries aux cellules épithéliales intestinales (Suhr et al., 1996). Elle a été initialement découverte dans des souches isolées de diarrhée chez l'homme. Elle est aussi présente chez des souches d'*E. coli* isolées de porcs souffrant de maladie de l'œdème, et de la diarrhée post-sevrage associée aux EPEC et aux ETEC (Tableau I) (Gyles et Fairbrother, 2004; Ngeleka et al., 2003). AIDA est impliquée dans la colonisation bactérienne, l'auto-agrégation et la formation de biofilm (Ravi et al., 2007). Chez les DAEC, elle a été reliée au phénotype d'adhérence diffuse présenté par des souches causant la diarrhée chez l'homme (Jallat et al., 1994).

### 3.1.2.4.La lymphostatine

Le gène *efal/lifA* code pour la lymphostatine, une protéine qui inhibe la transcription de cytokines pro-inflammatoires et la prolifération des lymphocytes (Klapproth et al., 1995). La lymphostatine est également impliquée dans l'adhésion (Tableau I) (Klapproth et al., 2005).

### 3.1.2.5.PAA

Le gène *paa* (pour *porcine A/E-associated*) a un rôle dans l'adhésion des EPEC (Batisson et al., 2003). Ce gène a été découvert dans des souches EPEC d'origine porcine, mais est présent chez d'autres EPEC, ainsi que chez les STEC et les ETEC (Tableau I) (An et al., 1999; Leclerc et al., 2007).

### 3.2. Adhérence intime et lésions de type attachant et effaçant

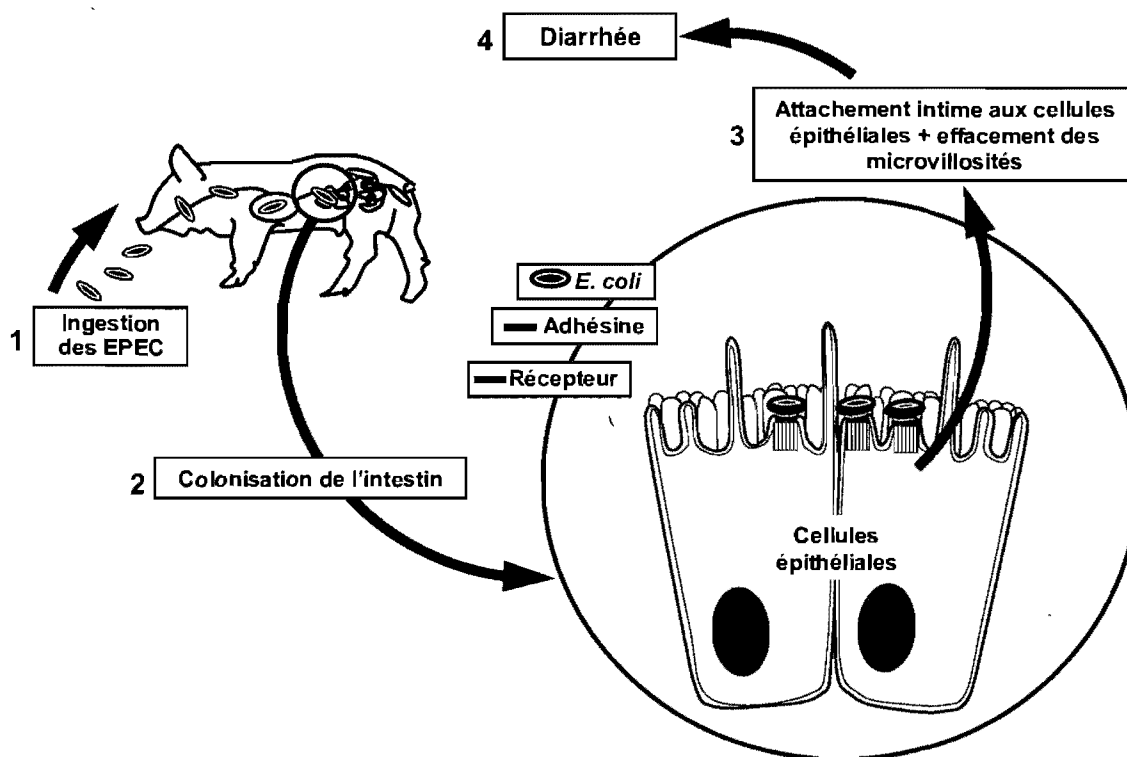


Figure 1 : Pathogénèse des infections aux EPEC

Une fois ingérés par l'hôte (1), les EPEC colonisent l'intestin (2) grâce à leurs adhésines. Les lésions A/E sont caractérisées par l'attachement intime des bactéries aux entérocytes et l'effacement des microvillosités aux alentours (3). La diarrhée (4) fait suite à la colonisation bactérienne. D'après Fairbrother, communication personnelle.

Quelle que soit l'espèce animale concernée, la pathogénèse des infections aux EPEC se déroule suivant des étapes similaires (Figure 1). L'attachement initial des bactéries à la muqueuse est suivi par l'expression du système de sécrétion de type III et de la translocation de différentes protéines effectrices. L'adhérence intime est due à la liaison entre l'intimine et son récepteur, Tir. Les lésions A/E sont caractérisées par l'effacement des microvillosités et l'adhérence intime entre la membrane bactérienne



et celle de la cellule hôte. La membrane cellulaire peut prendre l'aspect d'un piédestal portant la bactérie plus de 10  $\mu\text{m}$  au dessus de la cellule, en une structure similaire aux pseudopodes (Chen et Frankel, 2005). Les protéines effectrices vont aussi affecter la transduction de signal, modifier la perméabilité de la barrière intestinale et entraîner la réponse inflammatoire (Kaper et al., 2004).

Les lésions A/E sont liées à la présence d'un déterminant génétique particulier : le locus d'effacement des entérocytes (LEE). Ce locus, de 35,6 à 43 kb, renferme 41 cadres ouverts de lecture (ORF). Il est présent chez les bactéries causant des lésions A/E (EPEC, STEC et *C. rodentium*) et absent des souches ne produisant pas ce type de lésions. Son contenu en G + C (38%) est inférieur à celui du reste du génome d'*E. coli* (50,8%), laissant supposer un transfert horizontal à partir de matériel génétique étranger (Chen et Frankel, 2005; McDaniel et al., 1995). Le LEE regroupe sur 5 opérons l'intimine (gène *eae*), un système de sécrétion de type III (SSTT, protéines Esc et Sep), des chaperons (protéines Ces), des protéines de translocation (EspA, EspB et EspD), des protéines effectrices (EspF, EspG et Map) ainsi que le récepteur transloqué pour l'intimine (Tir) (Tableau I). Les facteurs codés par le LEE sont directement impliqués dans la formation des lésions A/E (McDaniel et al., 1995).

Tableau I : Facteurs de virulence retrouvés chez les EPEC.

Facteurs de virulence et fonction		Pathotype	Références
<b>Gènes du LEE</b>			
<i>eae</i>	Intimine Attachement intime	AEEC	(Kaper et al., 2004)
<i>espA</i>	Seringue moléculaire Translocation des protéines effectrices	AEEC	(Chen et Frankel, 2005)
<i>espB</i>	Pore de translocation Modulation du cytosquelette Effacement des microvillosités Inhibition de la phagocytose	AEEC	(Garmendia et al., 2004; Iizumi et al., 2007)
<i>espF</i>	Modulation du cytosquelette Polymérisation de l'actine Perturbation des jonctions serrées Perturbation des mitochondries Induction de l'apoptose Inhibition de la phagocytose	AEEC	(Dean et Kenny, 2009; Nougayrède et Donnenberg, 2004; Peralta-Ramirez et al., 2008)
<i>espG</i>	Destruction du réseau de microtubules Perturbation des jonctions serrées Inhibition du transport d'ions Cl <sup>-</sup>	AEEC	(Gill et al., 2007; Tomson et al., 2005)
<i>espH</i>	Modulation du cytosquelette Formation des filopodes et du piédestal	AEEC	(Tu et al., 2003)
<i>espZ</i>	Présent au site d'attachement des bactéries Rôle inconnu	AEEC	(Kanack et al., 2005)
<i>map</i>	Perturbation des mitochondries Formation des filopodes Effacement des microvillosités Perturbation des jonctions serrées	AEEC	(Berger et al., 2009; Ma et al., 2006)
<i>tir</i>	Récepteur transloqué pour l'intimine Attachement intime Polymérisation de l'actine, formation du piédestal Perturbation des jonctions serrées	AEEC	(Dean et Kenny, 2009; Kaper et al., 2004)
<b>Protéines sécrétées par le SSTT mais non présentes sur le LEE</b>			
<i>espJ</i>	Inhibition de la phagocytose par les macrophages	AEEC	(Marches et al., 2008)
<i>nleA</i>	Localisation au niveau de l'appareil de Golgi Inhibition de la synthèse protéique	AEEC	(Gruenheid et al., 2004; Kim et al., 2007)
<i>nleB</i>	Colonisation intestinale	AEEC	(Kelly et al., 2006)
<i>nleC</i>	Rôle inconnu	STEC	(Kelly et al., 2006)
<i>nleD</i>	Rôle inconnu	STEC	(Kelly et al., 2006)
<i>nleE</i>	Transmigration des neutrophiles	AEEC	(Zurawski et al., 2008)
<i>nleF</i>	Colonisation intestinale	STEC	(Echtenkamp et al., 2008)
<i>nleH</i>	Activation de la réponse immunitaire innée Colonisation intestinale	AEEC	(Garcia-Angulo et al., 2008; Hemrajani et al., 2008)

Autres facteurs de virulence			
<i>aidA1</i>	Adhérence diffuse chez les DAEC	Commun	(Benz et Schmidt, 1989; Ravi et al., 2007)
<i>astA</i>	EAST1 ( <i>heat-stable enterotoxin 1</i> ) des EAEC Induction de la sécrétion d'ions	Commun	(Kaper et al., 2004)
Opéron <i>bfp</i>	<i>Bundle-forming pili - Pilus</i> de type IV Adhérence initiale Auto-agrégation et formation de microcolonies	EPEC	(Kaper et al., 2004)
<i>efal/lifA</i>	<i>efal</i> : facteur d'adhésion des EPEC <i>lifA</i> : facteur d'inhibition de la prolifération des lymphocytes des STEC	AEEC	(Kaper et al., 2004; Klapproth et al., 1995)
<i>espC</i>	Autotransporteur sérine protéase Modulation du cytosquelette Protéolyse de l'hémoglobine	AEEC	(Drago-Serrano et al., 2006; Navarro-Garcia et al., 2004)
<i>fepC</i>	Métabolisme du fer	ExPEC	(Pierce et Earhart, 1986)
Opéron <i>fim</i>	Adhérence à des protéines contenant du alpha-D-mannose	Commun	(Kaper et al., 2004)
<i>fliC</i>	Sous unité flagellaire majeure (flagelline) Motilité et adhérence	Commun	(Kaper et al., 2004)
<i>fyuA</i>	Récepteur de la pesticine et de la yersiniabactine	ExPEC	(Kaper et al., 2004)
<i>hlyA</i>	Hémolysine A Lyse cellulaire	Commun	(Kaper et al., 2004)
<i>irp1</i> et <i>irp2</i>	Protéines de biosynthèse de la yersiniabactine	ExPEC	(Kaper et al., 2004; Schubert et al., 1998)
<i>iss</i>	Résistance au sérum	ExPEC	(Johnson et al., 2002)
Opéron <i>lpf</i>	<i>Long polar fimbriae</i>	AEEC	(Kaper et al., 2004)
<i>paa</i>	Protéine associée aux effets d'attachement et effacement chez le porc	AEEC ETEC	(An et al., 1999; Batisson et al., 2003)
<i>rtx</i>	Exoprotéine supposée de la famille RTX	AEEC	(Perna et al., 2001)
<i>set</i>	Entérotoxine supposée (homologue de ShET, l'entérotoxine de <i>S. flexneri</i> )	EAEC	(Jores et al., 2004)
<i>tsh</i>	Hémagglutinine sensible à la température Dégradation de l'hémoglobine	ExPEC	(Kaper et al., 2004)

### 3.2.1. Expression du système de sécrétion de type III

La transduction de signal est liée à l'expression du système de sécrétion de type III (Figure 2). Le SSTT est une seringue macromoléculaire qui injecte des protéines bactériennes directement dans la cellule hôte (Chen et Frankel, 2005; Garmendia et al., 2005). Chez les EPEC, il est dédié à la sécrétion de protéines spécifiques essentielles à la formation des lésions A/E, dont Tir, EspA, EspB ou EspD (Chen et Frankel, 2005). Les protéines qui forment le SSTT sont appelées Esc (pour EPEC

secretion). Les protéines EscC et EscN forment respectivement les anneaux de la membrane externe et de la membrane interne de la bactérie, reliés par la structure périsplasmique annulaire EscJ. La particularité du SSTT des EPEC est la présence d'une extension filamenteuse à l'extrémité de l'aiguille EscF, le filament EspA (Garmendia et al., 2005).

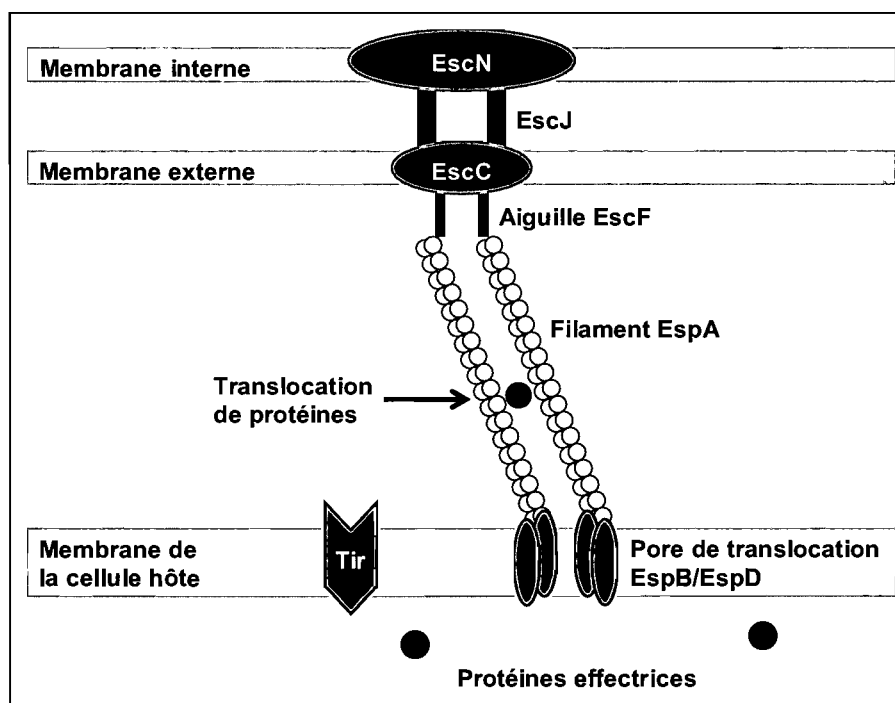


Figure 2 : Système de sécrétion de type III. D'après Chen et Frankel, 2005.

Les EPEC synthétisent un complexe en forme d'aiguille (protéines EscC, EscJ, EscN) qui traverse la paroi bactérienne. La polymérisation d'EspA à partir de l'extrémité de l'aiguille EscF mène à la formation d'un filament au travers duquel les protéines effectrices sont injectées dans la cellule hôte. Les protéines EspB et EspD forment le pore de translocation dans la cellule hôte.

Le filament EspA est présent à la surface de la bactérie dès les premiers stades de la formation des lésions A/E. Il s'agit d'un tube creux au travers duquel les protéines effectrices sont délivrées dans la cellule hôte. Les protéines EspB et EspD forment le pore de translocation (Figure 2), qui permet l'entrée des protéines

bactériennes dans la cellule hôte (Chen et Frankel, 2005; Garmendia et al., 2005). En plus de son rôle dans la translocation, EspB se localise dans le cytoplasme au niveau de la région d'attachement entre la bactérie et la cellule et altère la morphologie des fibres de stress (Chen et Frankel, 2005; Garmendia et al., 2005). Le filament EspA est également impliqué dans l'adhésion initiale des EPEC aux cellules (Chen et Frankel, 2005; Garmendia et al., 2005). Après la translocation des effecteurs, le SSTT et le filament EspA sont éliminées de la surface bactérienne (Garmendia et al., 2005).

Les effecteurs entraînent une importante réorganisation du cytosquelette de la cellule eucaryote : la dépolymérisation de l'actine et la formation d'actine filamenteuse ainsi que l'accumulation de diverses protéines du cytosquelette au site d'attachement des bactéries. Tout ceci est associé à l'effacement des microvillosités, à la perturbation de la perméabilité intestinale et à la formation de piédestaux aux sommets desquels sont intimement attachées les bactéries (Wales et al., 2005). Autour des bactéries, les microvillosités sont détruites alors qu'en périphérie des lésions, la hauteur des microvillosités peut atteindre 3  $\mu\text{m}$ . La taille normale des microvillosités est inférieure à 1  $\mu\text{m}$ . Ce stade précède l'effacement (Knutton et al., 1987b).

Une étude récente a soulevé le rôle de la clathrine dans la formation du piédestal des EPEC (Veiga et al., 2007). Chez la cellule eucaryote, l'endocytose dépendante de la clathrine permet l'internalisation de diverses macromolécules, dont les protéines transmembranaires (Veiga et Cossart, 2006). La clathrine est utilisée comme voie d'entrée par différents pathogènes intracellulaires, tels *Listeria*, *Yersinia*, *Salmonella* ou *Shigella*. De façon surprenante, chez les EPEC, elle ne semble pas impliquée dans l'internalisation, mais bien dans la formation du piédestal (Veiga et al., 2007).

### 3.2.2. Adhérence intime

L'adhérence intime est due à la liaison entre deux protéines bactériennes : l'intimine et son récepteur, Tir, le récepteur transloqué pour l'intimine (Wales et al., 2005). L'intimine appartient à une famille d'adhésines reliées aux invasines de

*Yersinia enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. Des homologues de l'intimine sont présents chez d'autres bactéries A/E comme les STEC ou chez *C. rodentium* (Nougayrède et al., 2003; Zhu et al., 1994). L'intimine est une protéine de la membrane externe codée par le gène *eae* (pour *E. coli attaching and effacing*). Elle est requise pour l'adhésion intime mais aussi pour la réorganisation du cytosquelette. L'extrémité N-terminale de cette protéine, insérée dans la membrane externe de la bactérie, est très conservée. Par contre, son extrémité C-terminale, extracellulaire, est impliquée dans la reconnaissance du récepteur et est donc variable (Nougayrède et al., 2003). Au moins quinze sous-types d'intimine ont été recensés jusqu'à présent (Adu-Bobie et al., 1998; Cookson et al., 2007; Oswald et al., 2000). Les différences d'intimine entraînent la spécificité d'hôte et le tropisme tissulaire (Frankel et al., 1994; Nougayrède et al., 2003). Chez le porc, les sous-types d'intimine les plus fréquents sont les sous-types bêta et thêta (Krause et al., 2005; Malik et al., 2006; Vu-Khac et al., 2007).

Les EPEC perturbent la polarité cellulaire, ce qui expose à la surface apicale de la cellule hôte des protéines habituellement associées à la membrane baso-latérale. Ainsi, l'intimine reconnaît, en plus de Tir, des récepteurs cellulaires : les  $\beta$ -intégrines et la nucléoline (Kaper et al., 2004).

Tir est transporté à l'intérieur de la cellule hôte par le SSTT (Kaper et al., 2004). Il recrute différentes protéines du cytosquelette au site d'interaction, principalement des protéines impliquées dans l'adhésion focale. L'adhésion focale est la zone d'attachement entre le cytosquelette et la matrice extracellulaire au moyen des intégrines (Garmendia et al., 2005; Nougayrède et al., 2003). Tir s'insère ensuite dans la membrane de la cellule hôte où il joue son rôle de récepteur pour l'intimine (Kaper et al., 2004). La portion intracytoplasmique de Tir interagit avec différentes protéines du cytosquelette, provoquant la polymérisation des filaments d'actine et la formation du piédestal (Figure 3) (Garmendia et al., 2005).

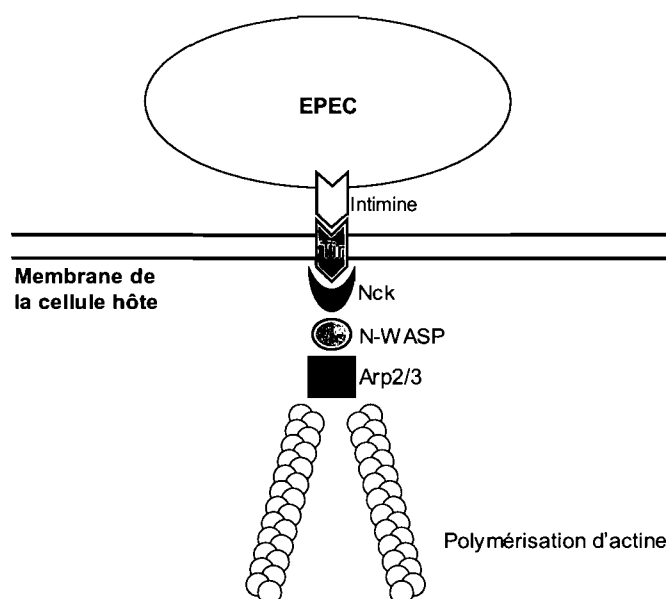


Figure 3 : Interaction de Tir avec les protéines du cytosquelette

Suite à sa liaison avec l'intimine, Tir recrute la protéine adaptatrice de la cellule hôte Nck. Nck active à son tour la protéine N-WASP, ce qui entraîne la polymérisation de l'actine filamenteuse due au complexe Arp2/3 et la formation du piédestal. D'après Frankel et Phillips, 2008.

Les EPEC recrutent l'actine via la protéine adaptatrice de l'hôte Nck (Figure 3). Récemment, deux effecteurs bactériens, TccP et TccP2, tous deux homologues à EspF, ont été découverts chez les STEC et certains EPEC (Campellone et al., 2004; Garmendia et al., 2004; Ogura et al., 2007). TccP et TccP2 miment Nck : ils activent la protéine adaptatrice N-WASP, et entraînent la polymérisation d'actine. Ces trois différents mécanismes peuvent coexister au sein d'une même souche et se produire simultanément dans la cellule hôte (Frankel et Phillips, 2008). Cependant, *in vivo*, la voie de polymérisation de l'actine via Nck n'est pas indispensable et en IVOC, le gène *tccP* n'est pas essentiel à la formation des lésions A/E par les STEC O157. Le rôle exact de la polymérisation de l'actine et l'avantage conféré par le piédestal à la bactérie ne sont pas encore clarifiés (Frankel et Phillips, 2008).

Le complexe Tir-intimine s'assemble sous forme de double dimère de conformation plane entre la membrane bactérienne et la membrane cellulaire (Nougayrède et al.,

2003; Pizarro-Cerda et Cossart, 2006). Cette conformation donne l'aspect très caractéristique des lésions A/E (Figure 4) dans laquelle les bactéries sont logées dans des structures en coupelle et où la distance séparant les membranes bactérienne et eucaryotes est de 10 nm (Knutton et al., 1987b).



Figure 4 : Lésions de type attachant-effaçant.

Microphotographie présentant l'aspect des lésions A/E en microscopie électronique à transmission (grossissement x 10.500). Les EPEC adhèrent intimement aux entérocytes (tête de flèche) et effacent la bordure en brosse (BB). Tiré de Girard et al., 2005a.

### 3.3. Internalisation

Les EPEC peuvent envahir les cellules eucaryotes au même titre que les *E. coli* entéro-invasifs et que les salmonelles (Wales et al., 2005). Lors des infections chez les différentes espèces hôtes, une minorité de bactéries peut être observée dans des vacuoles cytoplasmiques ou libres dans le cytoplasme (Wales et al., 2005). Dans certains cas, ils peuvent être retrouvés jusque dans la lamina propria (Hélie et al., 1991).

Un mécanisme possible pour l'internalisation est l'utilisation de claudine, d'occludine et de ZO-1, trois protéines qui font partie du complexe des jonctions serrées (Li et al.,



2008). Les EPEC entraînent une redistribution de ces protéines, habituellement limitées à la portion apicale de la membrane latérale, vers d'autres localisations dans la membrane de la cellule hôte, mais aussi vers le cytoplasme (Li et al., 2008; Muza-Moons et al., 2004; Peralta-Ramirez et al., 2008). Ce mécanisme pourrait aussi intervenir dans le déclenchement de la diarrhée. Comme il a été développé précédemment, les EPEC recrutent également la clathrine, une protéine impliquée dans l'endocytose. Bien que l'internalisation des EPEC n'ait pas été associée à ce phénomène, la clathrine intervient dans l'internalisation d'autres pathogènes intestinaux (Veiga et al., 2007).

### **3.4. Induction de la diarrhée**

La physiopathologie de la diarrhée due aux EPEC n'a toujours pas été clarifiée. Différentes hypothèses ont été avancées. Tout d'abord, la destruction des microvillosités et la perte des enzymes de la bordure en brosse entraînent un phénomène de malabsorption. Les EPEC modifieraient aussi directement la distribution ionique au travers de la membrane cellulaire. Ils perturbent l'intégrité des jonctions serrées et augmentent la perméabilité de l'épithélium. Enfin, l'attachement des EPEC aux cellules épithéliales entraîne l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B dans les cellules hôtes, ce qui augmente la production d'interleukine-8 et entraîne la transmigration des neutrophiles. La libération des médiateurs inflammatoires peut causer des lésions tissulaires (Chen et Frankel, 2005). Ces différents mécanismes agissant de concert contribueraient à l'apparition de la diarrhée. La diarrhée peut être bénéfique aux EPEC, puisqu'elle rompt l'équilibre entre l'hôte et sa flore commensale, ce qui offre au pathogène un avantage compétitif sur la flore intestinale normale (Chen et Frankel, 2005).

## **4. Modèles pour étudier les EPEC**

### **4.1. Les modèles *in vivo* et *ex vivo***

#### **4.1.1. Les études *in vivo***

Un des premiers modèles utilisés pour étudier la pathogénicité des EPEC est l'étude sur volontaires humains (Chen et Frankel, 2005). Dans les années 1970, ce modèle a permis de prouver que les EPEC, qui ne produisent pas de toxines et ne sont pas invasifs étaient malgré cela capables de provoquer la diarrhée (Levine et al., 1978). Depuis, le mécanisme par lequel les EPEC induisent la diarrhée est toujours à l'étude. Le porc a rapidement été utilisé pour étudier les EPEC d'origine humaine. Pour ce faire, les porcelets nouveau-nés sont prélevés de la mère par césarienne, privés de colostrum et maintenus en isolation. Chez ces animaux, les porcelets axéniques, les signes cliniques et les lésions histopathologiques sont similaires à ceux retrouvés dans le cas d'infections naturelles (Moon et al., 1983; Tzipori et al., 1985). Ce modèle a également servi à l'étude de la pathogenèse des souches EPEC d'origine porcine (Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994).

#### **4.1.2. La culture d'organe *in vitro***

Pour étudier les EPEC, il est également possible d'utiliser de la culture d'intestin de porcelet. L'avantage de la culture d'organe *in vitro* (IVOC) est qu'elle nécessite moins d'animaux, et que tous les médiateurs cellulaires sont présents. Cette technique a permis d'étudier le développement des lésions A/E (Zhu et al., 1995), d'établir le potentiel de virulence de la protéine bactérienne Paa (Batisson et al., 2003) et de déterminer le rôle de différents sous-type d'intimine dans l'adhérence des EPEC de différentes espèces (Girard et al., 2005a).

## 4.2. La culture cellulaire

Deux lignées cellulaires épithéliales d'origine humaine servent en routine pour étudier les EPEC : les cellules HeLa, isolées d'un adénocarcinome du col de l'utérus et les cellules HEp-2, isolées d'un carcinome du larynx et contaminées par les HeLa. Les souches EPEC d'origine humaine démontrent une forte adhérence aux cellules HEp-2, contrairement aux souches non-EPEC (Cravioto et al., 1979). De plus, elles présentent des patrons d'adhérence particuliers quand elles sont mises trois heures en contact avec ces cellules eucaryotes : l'adhérence localisée (LA), l'adhérence diffuse (DA) (Scaletsky et al., 1984).

Dans l'adhérence localisée, les bactéries adhèrent aux cellules sous forme de microcolonies discrètes, alors que dans l'adhérence diffuse, les bactéries adhèrent uniformément à la surface de la cellule (Figure 5) (Scaletsky et al., 1984; Trabulsi et al., 2002). Un patron similaire à l'adhérence localisée (appelé LAL pour *localized adherence-like*) est associé aux souches EPEC atypiques. Ce patron est caractérisé par la présence de microcolonies moins compactes et est corrélé à la présence d'intimine (Scaletsky et al., 1999). Un quatrième patron d'adhérence présenté par les *E. coli* pathogènes est l'adhérence agrégative. Dans ce dernier cas, les bactéries sont empilées à la manière de briques et adhèrent tant aux cellules qu'à la lame de verre entre les cellules (Nataro et al., 1987).

Le patron LA était initialement associé uniquement aux souches EPEC typiques (Scaletsky et al., 1984) et était fortement corrélé à certains sérogroupes fortement associés à des épisodes de diarrhée clinique (Chen et Frankel, 2005). Récemment il a été démontré que des souches atypiques pouvaient également présenter ce patron (Hernandes et al., 2008). Le patron LAL est habituellement associé aux EPEC atypiques, alors que les patrons DA et AA sont respectivement caractéristiques des DAEC et des EAEC (Trabulsi et al., 2002).

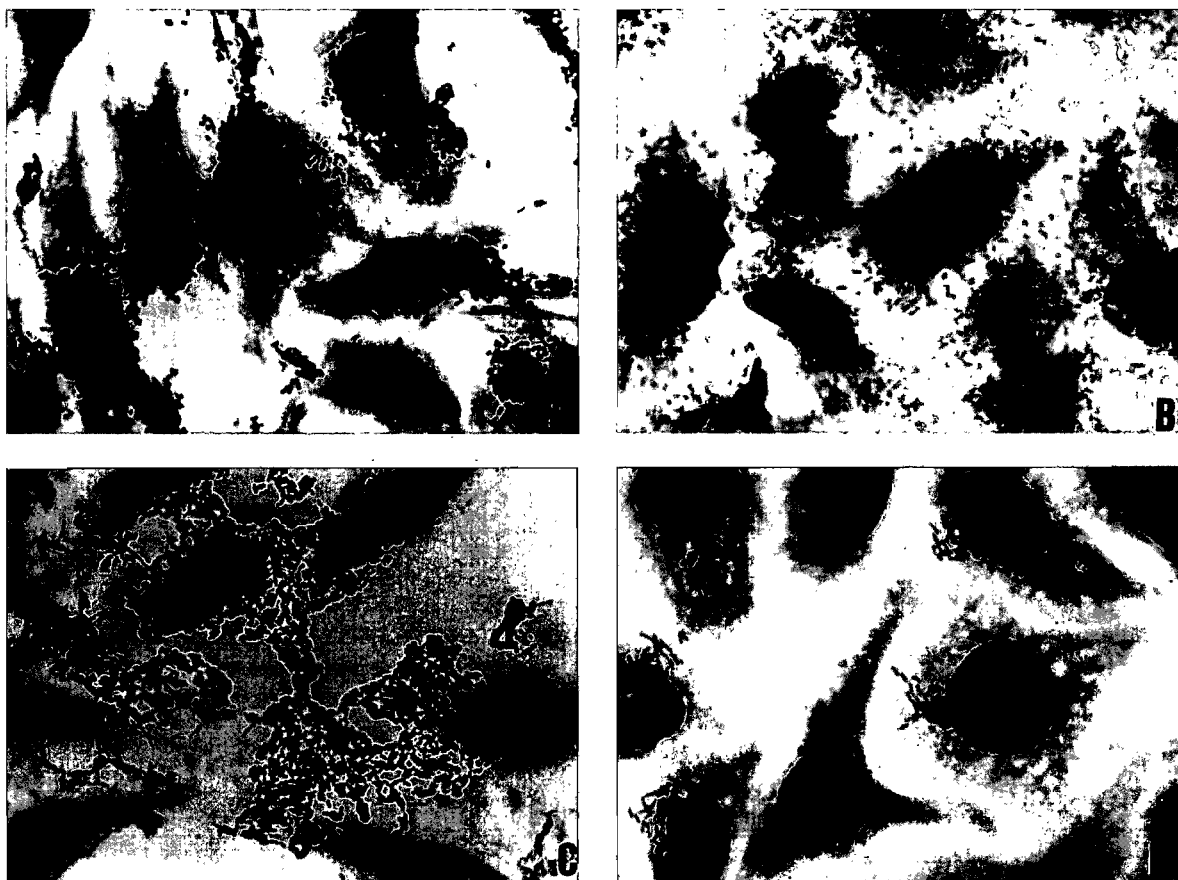


Figure 5 : Patterns d'adhérence présentés par les *E. coli* pathogènes intestinaux sur la lignée HEp-2.

A : adhérence localisée (LA) ; B : adhérence diffuse (DA) ; C : adhérence agrégative (AA) ; D : adhérence similaire à l'adhérence localisée (LAL). Tiré de Scaletsky et al., 1999.

Cependant, la seule méthode de diagnostic certifiant que les souches étaient bien des EPEC restait l'examen des lésions A/E au microscope électronique à transmission (Chen et Frankel, 2005). Les régions denses aux électrons sous le site d'adhésion sont constituées d'actine (Knutton et al., 1989; Knutton et al., 1987b). En colorant l'actine au moyen de phalloïdine marquée à la fluorescéine, Knutton et collaborateurs ont mis au point un test de diagnostic facile d'emploi : le test de coloration de l'actine fluorescente (ou *FAS test* pour *fluorescent actin staining test*) (Knutton et al., 1989). Le *FAS test* est devenu un outil de diagnostic très important

pour déterminer si les souches incriminées sont bien des AEEC puisqu'il est très sensible et spécifique (Knutton et al., 1991).

Les souches porcines adhèrent rarement sur des lignées cellulaires d'origine humaine HEP-2 ou HeLa (Malik et al., 2006; Zhu et al., 1994). Pour palier à cela, une lignée cellulaire issue de l'épithélium intestinal de porcelet, la lignée IPEC-J2, a été développée récemment (Schierack et al., 2006). Cette lignée a démontré son efficacité dans l'étude de divers pathogènes du porc, comme les STEC causant la maladie de l'œdème (Sonntag et al., 2005), les salmonelles (Brown et Price, 2007) et les ETEC (Koh et al., 2008).

Ce nouvel outil va nous permettre d'étudier l'adhérence de souches EPEC d'origine porcine dans un modèle homologue, et de cibler certains facteurs de virulence intervenant dans ce mécanisme.

## Matériel, méthodes et résultats

### **Porcine O45 enteropathogenic *Escherichia coli* belong to two phylogenetic groups with unique virulence factor profiles and *in vitro* adherence properties.**

Authors: Brïte Pauchet, Guillaume Bruant, Josée Harel, John Morris Fairbrother\*,  
Éric Nadeau

Address: The Reference Laboratory for *Escherichia coli*, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, 3200 Sicotte, Saint-Hyacinthe (Québec) J2S 7C6, Canada

\*Corresponding author: John M. Fairbrother

Email: [information retirée / information withdrawn] (J.M. Fairbrother)

Tel. : [information retirée / information withdrawn] or [information retirée / information withdrawn] Fax: [information retirée / information withdrawn]

Short Title: Adherence properties of porcine O45 EPEC

Article en préparation pour la revue *Veterinary Microbiology*.

## Abstract

Porcine O45 enteropathogenic *E. coli* (EPEC) are associated with post-weaning diarrhea in pigs and cause typical attaching and effacing (A/E) lesions. They possess the locus of enterocyte effacement (LEE) and the *eae* adhesin, but are EAF-negative. To date, adherence of porcine EPEC to the cell lines commonly used to study EPEC has not been demonstrated. The aim of the present work is to further study the initial adherence of porcine EPEC in the porcine intestinal cell line IPEC-J2, in relation to their virulence gene profile. Porcine O45 EPEC belong to the phylogenetic groups B1 and B2, consisting of three and two different virotypes, respectively. The B1 strains were isolated from 1981 through 2004, whereas no B2 strains were isolated after 1998. Strains of phylogroup B1 all possess the EPEC gene *paa*, O island OI-122 associated genes *efa1/lifA* and *set/ent*, and extra-intestinal *E. coli* genes *fyuA*, *irp* and *tsh* whereas strains of phylogroup B2 possess the EPEC gene *aida1* and the genes *rtx* and *ECs1282* of unknown function. All porcine O45 EPEC strains possess the LEE genes *eae-β* and *tir-1* and demonstrated adherence and A/E lesions in IPEC-J2 cells. At 4 h of incubation, the proportion of infected cells was statistically greater for B2 strains than for B1 strains and the non-EPEC control strain (respectively  $p < 0.0001$  and  $p = 0.0003$ ). At 8 h the proportion of highly infected cells ( $> 50$  bacteria/cell) was statistically greater for B2 strains than for B1 strains ( $p = 0.001$ ). Porcine O45 EPEC strains demonstrated mainly localized adherence-like and diffuse adherence patterns, and three strains displayed the localized adherence pattern. In conclusion, we demonstrated the presence of different virulence profiles in porcine O45 EPEC and

the suitability of IPEC-J2 cell line to study the pathogenesis of porcine EPEC infections.

Keywords: enteropathogenic *E. coli* / adherence / IPEC-J2 cell line / phylogenetic group / virulence profile



## 1. Introduction

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) are associated with postweaning diarrhea in pigs and have been shown *in vivo* and in *in vitro* organ culture (IVOC) to cause typical attaching and effacing (A/E) lesions (Girard et al., 2005a; Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994). These lesions are characteristic of EPEC, responsible for diarrhea in different animal species including human being, and of shiga-toxigenic *E. coli* (STEC), causing hemorrhagic colitis and hemolytic-uremic syndrome (Wales et al., 2005). The locus of enterocyte effacement (LEE) encodes the different proteins associated with the A/E phenotype: intimin (*eae*), translocated intimin receptor (*tir*) and other effectors which are secreted through a type III secretion apparatus (reviewed elsewhere).

Early work demonstrated that human EPEC induce a phenomenon called localized adherence (LA) in HEp-2 and HeLa cells *in vitro*. This has been attributed to the EAF and BFP factors. Subsequently, certain human EAF-negative strains were called atypical EPEC (Trabulsi et al., 2002). Atypical EPEC show different adherence patterns: LA, localized-like adherence (LAL) and diffuse adherence (DA) (Hernandes et al., 2008; Trabulsi et al., 2002).

*E. coli* strains are subdivided into four distinct phylogenetic groups named A, B1, B2 and D, with D and B2 being the most virulent in extra-intestinal *E. coli* (Clermont et al., 2000). EPEC belong to all phylogroups, but mainly B1 (Ishii et al., 2007; Tramuta et al., 2008). In atypical EPEC from human origin, groups B1 and D were weakly

associated to infant diarrhea whereas group B2 was associated to healthy controls (Afset et al., 2008).

Porcine EPEC are isolated from 3 to 25% of diarrheic piglets and from 10 to 89% of healthy piglets (Frohlicher et al., 2008; Hélie et al., 1991; Malik et al., 2006; Ngeleka et al., 2003; Vu-Khac et al., 2007). In Quebec, swine postweaning diarrhea due to EPEC is often associated with *E. coli* of the O45 serogroup (Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994). The A/E activity of porcine EPEC O45 isolates is highly correlated with the presence of the LEE (Zhu et al., 1994). Porcine strains are EAF-negative and to date, have not demonstrated adherence to any of the cells commonly used to study human EPEC.

Recently a new porcine intestinal line has been established (Schierack et al., 2006). This cell line was used to study the adherence or invasion properties of enteric pathogens such as *Salmonella* typhimurium, porcine oedema disease associated STEC and porcine enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) (Brown and Price, 2007; Koh et al., 2008; Sonntag et al., 2005). The aim of the present work were to further study the initial steps of adherence of porcine EPEC in IPEC-J2 cells, and to evaluate the relation between their phylogenetic grouping, virulence gene profile and adherence properties.

## **2. Materials and Methods**

### **2.1. Bacterial strains and growth condition**

A total of 27 porcine O45 EPEC isolates was used in this study (Table 1). Strains were isolated at the Faculté de médecine vétérinaire, Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada, from 1- to 13-week-old pigs with diarrhea during the period from 1981 to 2004. The O45 serogroup was determined using rabbit antisera (Ngeleka et al., 2003) and strains were stored in glycerol at -80°C before use. The wild-type non-pathogenic O115:K- strain ECL3463 (Ngeleka et al., 1992) was used as a non-EPEC strain (called hereafter non-EPEC strain) for adherence properties and as a negative control for attaching and effacing lesions. The O45 EPEC strain ECL1001 (Girard et al., 2005a; Zhu et al., 1994) was used as a positive control for adherence properties and production of attaching and effacing lesions.

## **2.2. Determination of virulence profile and phylogenetic group**

The porcine O45 EPEC strains were initially virotyped based on the presence of the *E. coli* virulence genes Aero, AFA, AIDA, CNF, Eae, EAST1, F4, F5, F6, F17, F18, F41, LT, P, Paa, STa, STb, Stx1, Stx2, Tsh, using colony hybridization (Ngeleka et al., 2003).

A more complete virulence profile was determined for 22/27 of the porcine O45 EPEC strains using an oligonucleotide microarray for the detection of 189 virulence genes (Bruant et al., 2006). The phylogenetic group of the O45 strains was assessed by microarray or PCR based on the presence or absence of genes *chuA*, *yjaA* and *tspE4.C2* (Clermont et al., 2000).

## **2.3. Cell culture**

The porcine non-transformed intestinal epithelial IPEC-J2 cell line was originally derived from the jejunum of a neonatal un-suckled piglet (Schierack et al., 2006). Cells were maintained on Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)/Ham's F-12 (1:1) medium (GibcoBRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS: GibcoBRL, Burlington, Ontario, Canada), 1% insulin-transferrin-selenium (ITS: GibcoBRL, Burlington, Ontario, Canada), epidermal growth factor (EGF) (5 ng/ml) (Invitrogen life technologies, Burlington, Ontario, Canada) and 0.1% penicillin-streptomycin (Invitrogen life technologies, Burlington, Ontario, Canada). Cultures were maintained in an atmosphere of 5% CO<sub>2</sub> at 37°C. Cells were seeded onto 24-well dishes with cover slip (Nunc™, Thermo Fisher Scientific, Rochester, NY, USA) previously coated with rat tail collagen (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) at 1 µg per well in a 0.5 ml volume. Cells were allowed to adhere for 24 h before being re-fed every other day for a total of 13-15 days of growth to allow confluence and formation of tight junction and microvilli. Twenty-four hours before experimentation, cells were re-fed with antibiotic-free medium.

#### **2.4. Interaction of porcine EPEC O45 with intestinal epithelial cells**

For the adherence assay, bacteria were grown overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoBRL, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 1% of D-mannose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) under agitation at 37°C and then transferred into fresh DMEM (Girard et al., 2005a) and grown for 4 h, corresponding to the early-exponential phase for all isolates, prior to use.

Bacterial inoculums were standardised to obtain a multiplicity of infection of 100:1. The adherence assay was performed as described by Scaletsky *et al.* (Scaletsky et al., 1984) with some modifications. Briefly, an inoculum of 100  $\mu$ l of each bacterial culture or 100  $\mu$ l of DMEM-1% D-mannose for non infected wells was added to each well and incubated for 30 min at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The 24-well dishes were then washed six times with DMEM, and 1 ml of medium devoid of antibiotics was added to each well. Incubation was then continued for 4 h or 8 h.

### **2.5. Light microscopy**

Cover slips were washed four times in DMEM and cells were fixed and stained with Diff Quik® (Dade Behring, Newark, DE, USA) and then mounted on glass slides. Slides were examined by light microscopy (x400) for the determination of the percentage of infected cells, the percentage of highly infected cells (> 50 bacteria/cell) and for bacterial adherence patterns on IPEC-J2 cells. For each strain, a minimum of 100 cells per slide were examined, and each result was based on three different experiments.

Adherence patterns were evaluated at 4 h of incubation according to patterns previously described for human EPEC, being localized adherence (LA), diffuse adherence (DA) (Scaletsky et al., 1984) and localized adherence-like (LAL) (Scaletsky et al., 1999).

### **2.6. Electron microscopy**

Cover slips were washed four times in DMEM and cells were fixed for 16 to 24 hours at 4°C in 2.5% glutaraldehyde and then rinsed in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate,

pH 7.3) for 1 h with regular changes. Samples for scanning electron microscopy (SEM) were then dehydrated in graded ethanol series, critical-point dried, mounted, sputter coated (8 to 10 nm) with gold, and examined at 5 kV in an S-3000N scanning electron microscope (Hitachi, Rexdale, Ontario, Canada).

Samples for transmission electron microscopy (TEM) were post-fixed for 1 h at room temperature in 2% osmium tetroxide ( $\text{OsO}_4$ ) and rinsed in cacodylate for 50 min with regular changes. Cells were then post-colored with uranyl acetate 0.5%, rinsed in maleate for 40 min and dehydrated in graded ethanol series. Cover slips were then bathed for 40 min in propylene oxide and embedded in Epon araldite (Canemco, Canton de Gore, Quebec, Canada). Thin sections were mounted on nickel squares, stained with lead citrate, and examined for A/E lesions with a Philips 201 transmission electron microscope at 80 kV (Philips Electronics, Eindhoven, The Netherlands).

## **2.7. Statistical analyses**

All experiments were performed in triplicate and numerical data are presented as means with error bars representing standard deviations. Group B1 included the positive control strain ECL1001. A repeated-measures linear model was used to examine quantitative measures of adherence with commercially available software (SAS version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC). Contrasts between pairs of means were conducted with the sequential Bonferroni correction. An exact chi-square test was performed to compare the association between adherence pattern and phylogenetic grouping. A *P* value of  $< 0.05$  was taken to be significant.

### 3. Results

#### 3.1. Porcine O45 EPEC belong to phylogenetic group B1 or B2

All 27 porcine EPEC O45 strains belong to phylogroup B1 (52%) or B2 (48%) as determined by the presence of the *chuA*, *yjaA*, and *TspE4.C2* genes (Table 1). Initial virotyping using colony hybridization based on the presence of 20 virulence genes commonly found in animal pathogenic and zoonotic *E. coli* demonstrated that, although all strains possessed *eae* characteristic of EPEC, the B1 and B2 strains belonged to three and two distinct virotypes, respectively (Table 1). Hence, all B2 strains and only one B1 strain possessed *aida1*, whereas *paa* was found in all B1 strains but was absent in B2 strains. Interestingly, the B1 strains were isolated from 1981 through 2004, whereas no B2 strains were isolated after 1998.

Twenty-two strains were further examined using a microarray designed for the detection of a wide range of known or potential virulence genes reported in the literature (Table 2). All strains possessed the LEE genes of the sub-types *eaeβ*, *tir-1*, *espA-1*, and *espB-3*, except the strain Eae:ast1:paa:aida that was negative for *espA-1* and one strain Eae:ast1:aida, negative for *espB-3*. All B1 strains but none of the B2 strains possessed the virulence genes *b1121*, *efal*, *flmA54*, *fyuA*, *irp1*, *irp2*, *lpfA<sub>O26</sub>*, *malX* and *nleA<sub>EHEC</sub>*. Similarly, *lpfA<sub>O113</sub>* and *set* were mostly found in B1 strains. On the other hand, only B2 strains possessed the virulence genes *ECs1282*, *lpfA<sub>O157/O1-141</sub>*, *nleA<sub>EPEC</sub>* and *rtx* and only B2 strains of virotype Eae:ast1:aida possessed *fepC*. Virulence genes *fimA* and *iss* were found in all *ast1*-positive strains.

### **3.2. Porcine O45 EPEC demonstrated adherence and A/E lesions on IPEC-J2 cells**

Bacterial adherence to IPEC-J2 cells was observed for all tested O45 EPEC strains at 4 h and increased with incubation time (Figure 1). The proportion of infected cells was statistically greater at 8 h of incubation than at 4 h for EPEC strains and for the non-EPEC control strain (respectively  $p < 0.0001$  and  $p = 0.015$ ). For EPEC strains, a more extensive adherence ( $> 50$  bacteria/cell) was observed in 6.8% and 28.8% cells at 4 h and 8 h, respectively ( $p < 0.0001$ ). The non-EPEC strain did not show any extensive adherence on IPEC-J2 cells, either at 4 h and at 8 h of incubation.

Three distinct adherence patterns were observed at 4 h of incubation. Most strains (26/27) demonstrated the LAL pattern (Figure 2a) and half of the strains (13/27) demonstrated the DA pattern in addition (Figure 2b). In addition, two strains of the virotype Eae: east1: aida and one strain of the virotype Eae: paa: east1: tsh displayed the LA pattern (Figure 2c). For the non-EPEC strain, a low level of adherence with no pattern was observed at 4 h and DA was observed at 8 h.

Bacteria intimately adhering to the apical cell membrane with cupping were observed on electron microscopy for all tested EPEC strains (Figure 3). A dense region underneath the adherence site was also frequently observed. EPEC strains closely adhered to enterocytes with occasional pedestal formation and internalisation. Internalisation and pedestal formation did not show any association with phylogroup or virulence genes. No changes in cell morphology were observed in uninfected



IPEC-J2 cells. No A/E lesions were observed for the non-EPEC control strain ECL3463.

### **3.3. Adherence of porcine O45 EPEC to IPEC-J2 cells depended to the phylogenetic group.**

At 4 h of incubation, the proportion of infected cells was statistically greater for B2 strains than for B1 strains and the non-EPEC control strain ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.0003$ , respectively) (Figure 4a). Furthermore, the proportion of highly infected cells ( $> 50$  bacteria/cell) was also statistically greater for B2 strains than for B1 strains and the non-EPEC control strain ( $p < 0.0001$  and  $p = 0.013$ , respectively). No significant difference was observed between group B1 and the non-EPEC control strain at 4 h of incubation, neither in the proportion of infected cells among the virotypes of either phylogroup.

Interestingly, the DA pattern was observed for 69.2% (9/13) of B2 and 28.6% (4/14) of B1 strains, this difference being marginally significant ( $p = 0.057$ ).

At 8 h of incubation, no difference was observed in the proportion of infected cells between B1 and B2 strains and with the non-EPEC control strain (Figure 4b). However, within group B1, the proportion of infected cells was greater for the virotype Eae:paa:east1:tsh than for virotypes Eae:paa:east1 and Eae:paa:east1:aida (80.5%, 36.1% and 34.7%, respectively) and no significant difference was observed between the two B2 virotypes. Moreover, the proportion of highly infected cells was statistically greater for B2 strains than for B1 strains and the non-EPEC control strain ( $p = 0.001$  and  $p < 0.0001$ , respectively) and for B1 strains than the non-EPEC

control strain ( $p = 0.0002$ ). Within group B2, the proportion of highly infected cells was greater for the virotype Eae:east1:aida than for the virotype Eae:aida (47.6% and 27.5%, respectively). No difference in the proportion of highly infected cells was observed between the three B1 virotypes.

#### 4. Discussion

We have shown that the porcine IPEC-J2 cell line is an effective model to study the adherence of porcine EPEC. All porcine EPEC strains examined in this study strongly adhered to IPEC-J2 cells and presented A/E lesions on electron microscopy at 8 h of incubation. It is noteworthy that adherence to cell lines of human origin, such as HEp-2 or HeLa cells, has rarely been reported for porcine EPEC (Malik et al., 2006; Zhu et al., 1994). Observed A/E lesions in the current study were similar to those previously described for porcine EPEC in pig ileal *in vitro* organ culture (Girard et al., 2005a), and for human EPEC in HEp-2 and CaCo-2 cell lines (Knutton et al., 1987; Knutton et al., 1989).

Because of its porcine origin, the IPEC-J2 cell line is a good model to study pig pathogens in general. Hence it represents an excellent model for studying EPEC because it originated from intestinal tissue, the preferred site of attachment of porcine EPEC, of the homologous animal species. Interestingly, we observed occasional pedestal formation and bacterial internalisation, not found in the porcine kidney PK15 cell line following infection with porcine EPEC (Malik et al., 2006). Bacterial internalisation in intestinal epithelial cells was previously observed with porcine O45

EPEC *in vivo* (Hélie et al., 1991). Moreover, this is the first time that several different adherence patterns have been described for porcine EPEC strains. These patterns are similar to those previously observed for EPEC of human origin (Scaletsky et al., 1984).

Porcine O45 EPEC strains belong to two phylogenetic groups, the phylogroups B1 and B2. Usually, EPEC from animal origin belong to all four phylogroups, mainly B1 (Ishii et al., 2007; Tramuta et al., 2008). As all strains possess the LEE, it is probable that this locus is, for the most part, responsible for the intimate adherence. Nevertheless, when adherence was compared between strains, we observed that B2 strains adhered more extensively to the IPEC-J2 cells than B1 strains at both 4 h and 8 h of incubation. Hence, we looked for virulence genes that could explain these differences. B2 strains belong to two virotypes, which possess the *ECs1282*, *lpfA*<sub>O157/O1-141</sub> and *rtx* STEC virulence genes and the *aidA1* gene. It is interesting to note that in the phylogroup B2, the genes *fimA*, *iss* and *fepC* are unique to the virotype Eae:east1:aida whereas *hlyA* is present in all Eae:aida strains. On the other hand, strains of phylogroup B1 can be subdivided into three virotypes, different to those of phylogroup B2, Eae:east1:paa, Eae:east1:paa:tsh and Eae:east1:paa:aida. In addition, they possess numerous genes associated with ExPEC, such as *fyuA*, *irp1*, *irp2*, *iss*, *lpfA*<sub>O113</sub> and *tsh*, and with AEEC, such as *efa1*, *lpfA*<sub>O26</sub>, *paa* and *set*. Finally, different variants of the genes *lpfA* and *nleA* are present in the B1 and B2 groups.

A different set of virulence genes than those associated with phylogroup B1 are found in strains of phylogroup B2. One of these genes, *aidA1*, encodes the adhesin involved

in diffuse adherence, AIDA-I, an outer membrane autotransporter protein, initially identified in strains associated with diarrhea in humans (Benz and Schmidt, 1992). In pigs, AIDA-I has been associated with bacterial colonisation, auto-aggregation and biofilm formation (Ravi et al., 2007), all mechanisms known to enhance virulence and persistence in the host. This adhesin is frequently isolated from clinical cases of porcine post-weaning diarrhea due to EPEC and ETEC (Ngeleka et al., 2003). The finding in our study of a greater proportion of B2 strains inducing the DA pattern suggests an involvement of the AIDA-I adhesin in this adherence. Further work is needed to confirm this hypothesis.

The differences in the virulence gene patterns observed between B1 and B2 strains could also influence the pathogenic potential *in vivo* of porcine O45 EPEC strains and their persistence in the host or in the environment. Interestingly, some of these strains have been previously studied in an *in vivo* gnotobiotic piglet model, in which the B1 strains demonstrated more pathogenic potential than the B2 strains (Zhu et al., 1994). The onset of diarrhea was more rapid for B1 strains, being 24-41 h versus 70-96 h or not at all for B2 strains. Moreover, B1 strains induced more extensive A/E lesions, with severe effacement of microvilli, affecting more than 90% of intestinal villi in the caecum and proximal colon. They also resulted in more severe inflammation, the lamina propria of the small and large intestine being more heavily infiltrated by neutrophils. In addition, strains of the B1-associated virotypes predominate among EPEC isolated currently in clinical cases of post-weaning diarrhea (John Fairbrother, Reference Laboratory for *Escherichia coli*, personal communication). In swine,

EPEC are often isolated from farms with a history of diarrhea due to ETEC and other pathogens. Moreover, EPEC are often isolated from healthy piglets (Frohlicher et al., 2008; Malik et al., 2006; Vu-Khac et al., 2007). The host immune response is crucial for the control of the extent of the infection in pigs (Girard et al., 2005b). This suggests that porcine EPEC is an opportunistic agent of post-weaning diarrhea.

The *in vivo* and clinical findings may be explained by the presence of certain virulence genes in B1 strains. For example, the B1 genes *efal/lifA* and *set/ent* both belong to the pathogenicity island (PAI) OI-122 of STEC O157:H7 (Perna et al., 2001). OI-122 is specific to A/E pathogens as it has not been observed in the other *E. coli*. It can form a mosaic PAI with the LEE (Morabito et al., 2003). It has been associated with outbreaks of diarrhea and hemolytic-uremic syndrome due to O157 and non-O157 STEC (Karmali et al., 2003; Wickham et al., 2006). In atypical EPEC, the OI-122 genes *efal/lifA* and *set/ent* were strongly associated with childhood diarrhea (Afset et al., 2006). It is noteworthy that the porcine EPEC O45 ECL1001, belonging to the phylogroup B1, has been shown to possess this OI-122 PAI (Morabito et al., 2003). Thus, we can reasonably suppose that the other B1 strains also possess this island. The *set/ent* gene encodes a *Shigella* ShET-2 enterotoxin homologue (Perna et al., 2001) whereas the *efal/lifA* gene encodes the lymphostatin, which has been shown to inhibit lymphocyte proliferation and proinflammatory cytokines production and has also been reported to have adhesive properties (Klapproth et al., 1995; Klapproth et al., 2005). Hence, the *efal/lifA* gene can modulate the inflammatory response and participate in the difference of immune

response observed *in vivo* between the strains. Its adhesive properties may enhance the survival and persistence of B1 strains in the porcine intestine.

As observed with the virulence genes present on OI-122, *paa*, encoding another adhesive or regulatory factor specific to B1 strains, has also been associated with childhood diarrhea due to atypical EPEC (Afset et al., 2006). The porcine A/E-associated gene *paa* was discovered in porcine O45 EPEC strains and is also present in EPEC from various animal species, in STEC O157:H7 and in ETEC (An et al., 1999; Leclerc et al., 2007). This virulence determinant is highly correlated with the A/E phenotype in AEEC and is involved in the adherence of porcine strain ECL1001 (Batisson et al., 2003). Its presence in porcine O45 EPEC B1 strains may be an indication of its role in the pathogenicity, by mediating adherence or by modulating the expression of other adhesive factors. Indeed, a role for Paa in modulating bacterial adherence of porcine EPEC strain ECL1001 has been demonstrated by *paa* mutation complementation experiments in the IPEC-J2 cell line (Élodie Destable, Université de Montréal, personal communication).

The two B2 virotypes seem to possess different iron acquisition systems: the gene *fepC* is present only in strains of the virotype Eae: east: aida, which adhered to IPEC-J2 cells at 8h of incubation more strongly than the other B2 virotype, Eae: aida. In contrast, the haemolysin gene *hlyA* is present in all Eae: aida strains and in one of the Eae: east1: aida strain, and all B2 strains possess the *chuA* gene coding for a haem receptor. The pore-forming toxin alpha-hemolysin HlyA is associated with virulence in uropathogenic *E. coli* (Wiles et al., 2008) and STEC (Karmali et al., 2003) whereas

the gene *fepC* encodes a membrane protein involved in the transport of iron by the siderophore enterobactin (Shea and McIntosh, 1991). Strains of phylogroup B1 also possess genes associated with ExPEC, such as *fyuA*, *irp1* and *irp2*. In *Yersinia pestis*, the *fyuA-irp* pathogenicity island encodes an iron uptake system mediated by the siderophore yersiniabactin and contributes to its virulence (Schubert et al., 1998). This PAI is found in some EPEC, EIEC and ETEC isolates (Schubert et al., 1998) as well as in certain STEC (Karch et al., 1999). Free iron is strictly limited in the host and there is a competition between the host and the pathogenic bacteria for this trace element. Thus, detection of the *fyuA* and *irp2* genes could be indicative of the presence of the PAI in porcine EPEC O45 strains and their presence could confer a selective advantage by capturing the iron during internalisation.

The maltose-maltodextrin system of *E. coli malX* has no known direct role in virulence but is a PAI marker in ExPEC (Johnson et al., 2002). It could have a similar function in porcine EPEC. Most strains of phylogroup B1 possess the gene *tsh*, which is an important virulence marker in avian pathogenic *E. coli* (Dozois et al., 2000; Ngeleka et al., 2002). The product of this gene displays both adhesive and proteolytic properties (Kostakioti and Stathopoulos, 2004) and could have a role in the early stages of infection (Dozois et al., 2000). It is here reported for the first time in porcine EPEC. This factor may represent an important virulence marker for porcine EPEC strains. The presence of multiple virulence genes in the phylogroup B1 could suggest that, similarly to the situation for ExPEC, the severity of the disease observed *in vivo* could partly be due to an additive effect of the extensive repertoire of virulence genes.

Surprisingly, three strains demonstrated the LA pattern. None of our porcine EPEC O45 strains possess the *eaf* gene whereas six possess the *bfpA* gene. However, only two of these *bfpA* positive strains displayed the LA pattern. The LA pattern did not show any association with any other gene from the microarray. Thus, it was not possible to attribute the LA pattern of these porcine strains to any peculiar virulence effector, even the BFP.

In conclusion, IPEC-J2 cells appear to be a useful model for the study, in a homologous system, of the development of A/E lesions due to porcine EPEC and of the modulatory effect on A/E lesions of EHEC- and EPEC-associated effector molecules. The various non-LEE genes discussed here are not essential for the development of A/E lesions in the IPEC-J2 cells, as this phenomenon was observed in their absence. However, they may have a role in the modulation of adherence, which could be studied in this model. In addition, the different virulence profiles present in the porcine O45 EPEC may influence their pathogenicity in post-weaning diarrhea.

### **Acknowledgements**

We thank Guy Beauchamp for statistical analysis, Diane Montpetit and Céline Lussier for electron microscopy and Clarisse Desautels for technical assistance. We thank Dr. Anthony Blikslager, North Carolina University, USA, for providing IPEC-J2 cells. This work was supported by the Natural Sciences Engineering Research



Council of Canada, the Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc and the Centre de Recherche en Infectiologie Porcine.

## References

- Afset, J.E., Anderssen, E., Bruant, G., Harel, J., Wieler, L., Bergh, K., 2008, Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2280-2290.
- Afset, J.E., Bruant, G., Brousseau, R., Harel, J., Anderssen, E., Bevanger, L., Bergh, K., 2006, Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3703-3711.
- An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Harel, J., 1999, Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473, 179-184.
- Batisson, I., Guimond, M.P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M., Jacques, M., Harel, J., 2003, Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 71, 4516-4525.
- Benz, I., Schmidt, M.A., 1992, Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). *Infect. Immun.* 60, 13-18.
- Brown, D.R., Price, L.D., 2007, Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) from porcine small intestine. *Vet. Microbiol.* 120, 328-333.
- Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R., Harel, J., 2006, Development and validation of an oligonucleotide microarray for

- detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3780-3784.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000, Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555-4558.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtiss, R., 3rd, 2000, Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68, 4145-4154.
- Frohlicher, E., Krause, G., Zweifel, C., Beutin, L., Stephan, R., 2008, Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiol* 8, 144.
- Girard, F., Batisson, I., Frankel, G.M., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2005, Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. *Infect. Immun.* 73, 6005-6016.
- Girard, F., Oswald, I.P., Taranu, I., Helie, P., Appleyard, G.D., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2005, Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. *Infect. Immun.* 73, 5514-5523.
- Hélie, P., Morin, M., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1991, Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infect. Immun.* 59, 814-821.
- Hernandes, R.T., Silva, R.M., Carneiro, S.M., Salvador, F.A., Fernandes, M.C., Padovan, A.C., Yamamoto, D., Mortara, R.A., Elias, W.P., da Silva Briones, M.R., Gomes, T.A., 2008, The localized adherence pattern of an atypical

enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. *Cell Microbiol* 10, 415-425.

Ishii, S., Meyer, K.P., Sadowsky, M.J., 2007, Relationship between phylogenetic groups, genotypic clusters, and virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains from diverse human and animal sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5703-5710.

Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., O'Bryan, T.T., Maslow, J.N., 2002, Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* 185, 1439-1447.

Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Olschlager, T., Hacker, J., 1999, A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67, 5994-6001.

Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., 2003, Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4930-4940.

Klapproth, J.M., Donnenberg, M.S., Abraham, J.M., Mobley, H.L., James, S.P., 1995, Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphocyte activation and lymphokine production. *Infect. Immun.* 63, 2248-2254.

Klapproth, J.M., Sasaki, M., Sherman, M., Babbin, B., Donnenberg, M.S., Fernandes, P.J., Scaletsky, I.C., Kalman, D., Nusrat, A., Williams, I.R., 2005, *Citrobacter rodentium* *lifA/efal* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia in vivo. *Infect. Immun.* 73, 1441-1451.

- Knutton, S., Baldini, M.M., Kaper, J.B., McNeish, A.S., 1987, Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 55, 78-85.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S., 1989, Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57, 1290-1298.
- Koh, S.Y., George, S., Brozel, V., Moxley, R., Francis, D., Kaushik, R.S., 2008, Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 130, 191-197.
- Kostakioti, M., Stathopoulos, C., 2004, Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 72, 5548-5554.
- Leclerc, S., Boerlin, P., Gyles, C., Dubreuil, J.D., Mourez, M., Fairbrother, J.M., Harel, J., 2007, *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res. Microbiol.* 158, 97-104.
- Malik, A., Toth, I., Beutin, L., Schmidt, H., Taminiou, B., Dow, M.A., Morabito, S., Oswald, E., Mainil, J., Nagy, B., 2006, Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eae*<sup>+</sup> *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 114, 82-93.
- Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., Caprioli, A., 2003, A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect. Immun.* 71, 3343-3348.

- Ngeleka, M., Brereton, L., Brown, G., Fairbrother, J.M., 2002, Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. *Avian Dis.* 46, 143-152.
- Ngeleka, M., Harel, J., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1992, Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K "V165" :F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect. Immun.* 60, 5048-5056.
- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D.M., Fairbrother, J.M., 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, 242-252.
- Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001, Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529-533.
- Ravi, M., Ngeleka, M., Kim, S.H., Gyles, C., Berthiaume, F., Mourez, M., Middleton, D., Simko, E., 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, 308-319.
- Scaletsky, I.C., Pedroso, M.Z., Oliva, C.A., Carvalho, R.L., Morais, M.B., Fagundes-Neto, U., 1999, A localized adherence-like pattern as a second pattern of adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 67, 3410-3415.

- Scaletsky, I.C., Silva, M.L., Trabulsi, L.R., 1984, Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 45, 534-536.
- Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K.D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., Wieler, L.H., 2006, Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem. Cell Biol.* 125, 293-305.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., Heesemann, J., 1998, Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* 66, 480-485.
- Shea, C.M., McIntosh, M.A., 1991, Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 1415-1428.
- Sonntag, A.K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L.H., Schmidt, M.A., Karch, H., 2005, Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8855-8863.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Tardelli Gomes, T.A., 2002, Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 508-513.
- Tramuta, C., Robino, P., Nebbia, P., 2008, Phylogenetic background of attaching and effacing *Escherichia coli* isolates from animals. *Vet. Res. Commun.* 32, 433-437.
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., Lopez, C., Gonzalez, E.A., Blanco, J., 2007, Serotypes, virulence genes,

intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Vet. J.* 174, 176-187.

Wales, A.D., Woodward, M.J., Pearson, G.R., 2005, Attaching-effacing bacteria in animals. *J. Comp. Pathol.* 132, 1-26.

Wickham, M.E., Lupp, C., Mascarenhas, M., Vazquez, A., Coombes, B.K., Brown, N.F., Coburn, B.A., Deng, W., Puente, J.L., Karmali, M.A., Finlay, B.B., 2006, Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *J. Infect. Dis.* 194, 819-827.

Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008, Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 11-19.

Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M.S., Beaudry, M., Fairbrother, J.M., 1994, Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect. Immun.* 62, 4153-4159.



**Figures and Tables:**

**Table 1:** Porcine O45 EPEC strains used in this study.

**Table 2:** Distribution of additional virulence genes in virotypes and phylogenetic groups of 22/27 porcine EPEC O45 strains.

**Figure 1:** Adherence of porcine EPEC strains to IPEC-J2 cells.

Proportion of infected cells increased with incubation time, as seen at 4 h (unfilled boxes) and 8 h (filled boxes) of incubation. Results are presented as the mean  $\pm$  the standard deviation, and  $P < 0.05$  was considered significant.

**Figure 2:** Adherence patterns after 4 h of incubation for porcine EPEC O45 strains on IPEC-J2 cells.

Micrographs illustrating the different adherence patterns observed for porcine EPEC O45 strains on IPEC-J2 cells: (a) strain ECL2028 showing localized-like adherence (black arrow), (b) strain ECL2019 showing diffuse adherence (black arrow) and (c) strain ECL2054 showing localized adherence (black arrow) (magnification x40).

**Figure 3:** Representative micrographs of attaching and effacing lesions caused by O45 porcine EPEC strains on IPEC-J2 cells.

(a) Strain ECL2060 intimately attached in cup-like formation to an IPEC-J2 cell (white arrow) (TEM; magnification 10,000); (b) effacement of microvilli around a microcolony of strain ECL1001 (white arrow) (SEM; magnification 12,000); (c)

pedestal beneath strain ECL2076 (black arrow) (SEM; magnification 8,000); (d) internalisation of strain ECL2059 (white arrow) (TEM; magnification 10,000).

**Figure 4:** Difference in the adhesion of strains belonging to the two phylogenetic groups.

(a) At 4 h of incubation, the proportion of infected cells (unfilled boxes) and the proportion of highly infected cells (> 50 bacteria/cell) (filled boxes) were statistically greater for group B2 than for group B1 and the non-EPEC strain (\*).

(b) At 8 h of incubation, the proportion of highly infected cells (> 50 bacteria/cell) (filled boxes) was statistically greater for group B2 than for group B1 and the non-EPEC strain (\*), and for group B1 than the non-EPEC strain (\*\*).

Results are presented as the mean  $\pm$  the standard deviation.  $P < 0.05$  was considered significant (\*) by post hoc analysis (Bonferroni's test).

Table 1.

Strain	Year of isolation		Description and origin			Virotype	Phylogroup*1	References
	Year of isolation	Age of pigs (wk)	Tissue	Anamnesis				
ECL3463 (82-862) *2	1982	2	ileum	diarrhea		negative	B1	(Ngeleka et al., 1992)
ECL2004 (81-4420)	1981	4	n.d.	diarrhea		Eac:paa:cast1:tsh	B1	(Zhu et al., 1994)
ECL2011 (84-2461)	1984	6-8	feces	diarrhea		Eac:paa:cast1:tsh	B1	This study
ECL2028 (90-1513) *2	1990	5	ileum	n.d.		Eac:paa:cast1:tsh	B1	(Zhu et al., 1994)
ECL2029 (90-2061) *2	1990	5	ileum	diarrhea		Eac:paa:cast1:tsh	B1	(Zhu et al., 1994)
ECL2033 (91-19-172)	1991	6	n.d.	diarrhea		Eac:paa:cast1:tsh	B1	(Zhu et al., 1994)
ECL2058 (91-5185A1)	1991	10	n.d.	death		Eac:paa:cast1:tsh	B1	This study
ECL2042 (95-5682)	1995	6	ileum	diarrhea		Eac:paa:cast1:tsh	B1	This study
ECL2060 (98-5193A1)	1998	10	ileum	n.d.		Eac:paa:cast1:tsh	B1	This study
ECL2065 (02-C863A3)	2002	8	ileum	diarrhea-pneumonia		Eac:paa:cast1:tsh	B1	This study
ECL2066 (02-G155A2)	2002	3-4	ileum	diarrhea-meningitis-arthritis		Eac:paa:cast1:tsh	B1	This study
ECL2069 (04958A2il)	2004	8-10	ileum	wasting-death		Eac:paa:cast1:tsh	B1	This study
ECL1001 (86-1390)	1986	4-5	ileum	diarrhea		Eac:paa:cast1	B1	(Girard et al., 2005a; Zhu et al., 1994)
ECL2053 (04-1638-3-175)	2004	n.d.	spleen	n.d.		Eac:paa:cast1	B1	This study
ECL9133 (00-H410B3)	2000	3	ileum	diarrhea-pneumonia		Eac:paa:cast1:aida	B1	This study
ECL2020 (88-4299C)	1988	5	ileum	dysentery		Eac:cast1:aida	B2	(Zhu et al., 1994)
ECL2035 (94-1458-173)	1994	n.d.	intestine	n.d.		Eac:cast1:aida	B2	This study
ECL2059 (96-8388C)	1996	6	ileum	diarrhea-pneumonia		Eac:cast1:aida	B2	This study
ECL2054 (98-9239)	1998	6	intestine	n.d.		Eac:cast1:aida	B2	This study
ECL2055 (98-9359)	1998	3-4	ileum	diarrhea		Eac:cast1:aida	B2	This study
ECL2005 (82-4378) *2	1982	3-5	ileum	diarrhea		Eac:aida	B2	(Zhu et al., 1994)
ECL2078 (83-2315)	1983	1-2	ileum	diarrhea		Eac:aida	B2	(Zhu et al., 1994)
ECL2077 (85-1134)	1985	1-2	ileum	n.d.		Eac:aida	B2	(Zhu et al., 1994)
ECL2018 (86-4733) *2	1986	6	ileum	dysentery		Eac:aida	B2	(Zhu et al., 1994)
ECL2076 (87-4725)	1987	4-5	n.d.	diarrhea		Eac:aida	B2	(Hélie et al., 1991)
ECL2019 (88-1861) *2	1988	3-4	ileum	diarrhea-respiratory problems		Eac:aida	B2	(Zhu et al., 1994)
ECL2027 (89-56-196)	1989	13	n.d.	pleuresy-pericarditis		Eac:aida	B2	(Zhu et al., 1994)
ECL2057 (91-3863-175)	1991	n.d.	n.d.	diarrhea		Eac:aida	B2	This study

\*1: Phylogenetic group based on the presence or the absence of *chuA*, *yjaA* and *tspE4.C2*; \*2: No microarray data available for these strains; n.d.: no data

Table 2.

Phylo genetic group	Virotype	No of strains	% strains positive by microarray for gene:								
			<i>b1121, efa1</i> <i>flmA54, fyuA, irp1</i> <i>irp2, lpfA<sub>O26</sub>, malX</i> <i>nleA<sub>EHEC</sub></i>	<i>lpfA<sub>O113</sub></i>	<i>set</i>	<i>fimA</i> <i>iss</i>	<i>hlyA</i>	<i>traT</i>	<i>fliC</i>	<i>fepC</i>	<i>ECs1282</i> <i>lpfA<sub>O157/O1-141</sub></i> <i>nleA<sub>EPEC</sub></i> <i>rtx</i>
B1	Eae:paa:east1: tsh	9	100%	100%	100%	100%	0%	44%	55%	0%	0%
B1	Eae:paa:east1	2	100%	50%	100%	100%	0%	100%	0%	0%	0%
B1	Eae:paa:east1: aida	1	100%	0%	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%
B2	Eae:east1: aida	5	0%	0%	0%	100%	20%	100%	100%	100%	100%
B2	Eae:aida	5	0%	0%	20%	0%	100%	100%	100%	0%	100%

**Figure 1.**

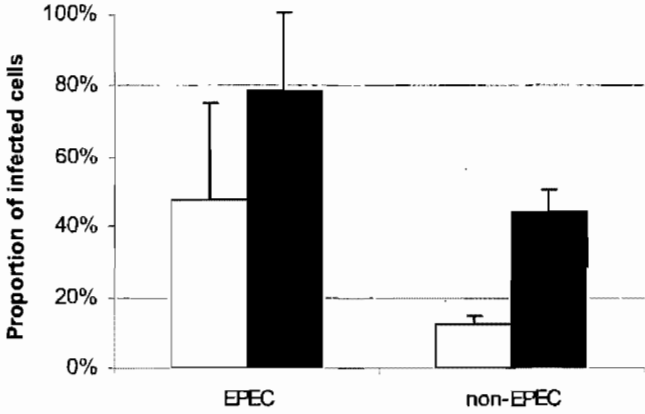


Figure 2.

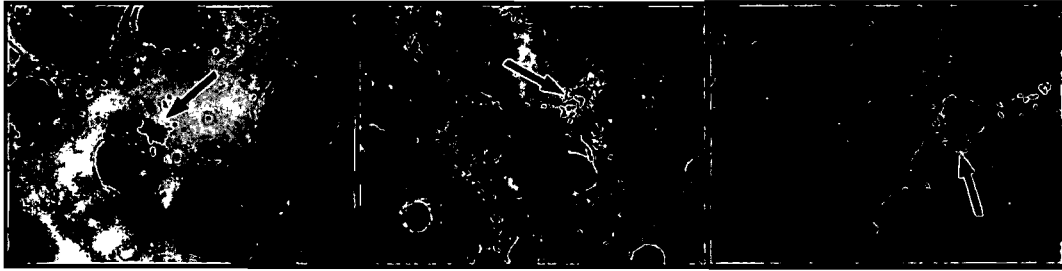
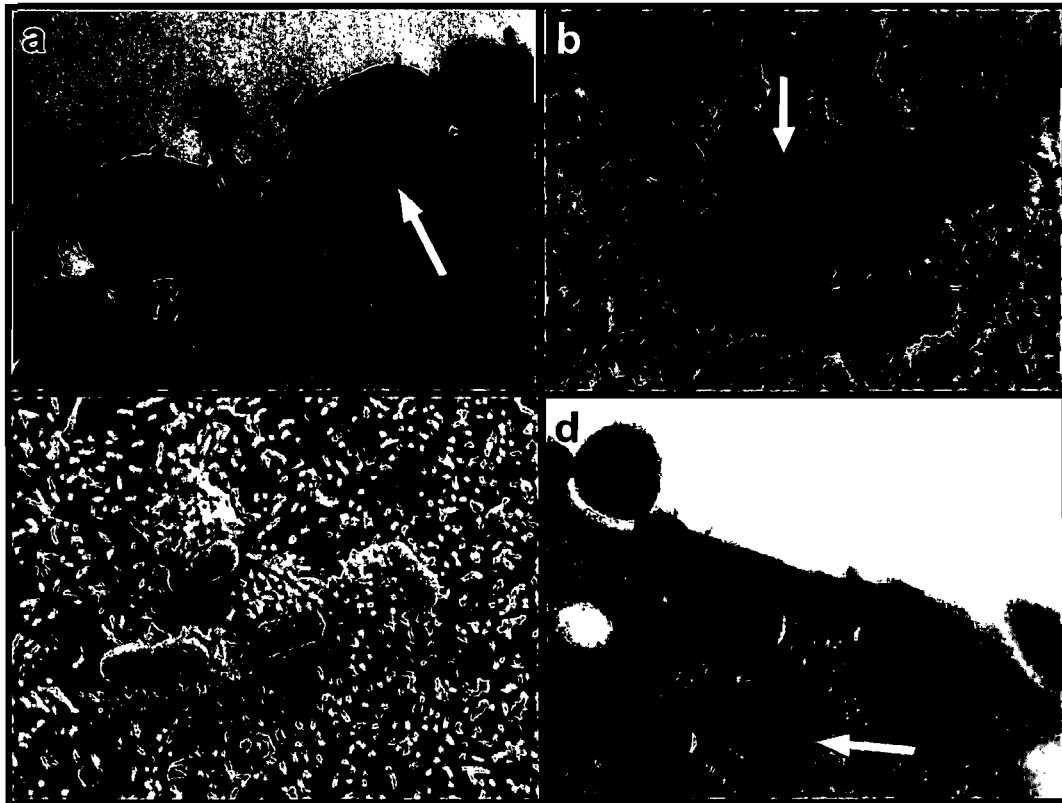
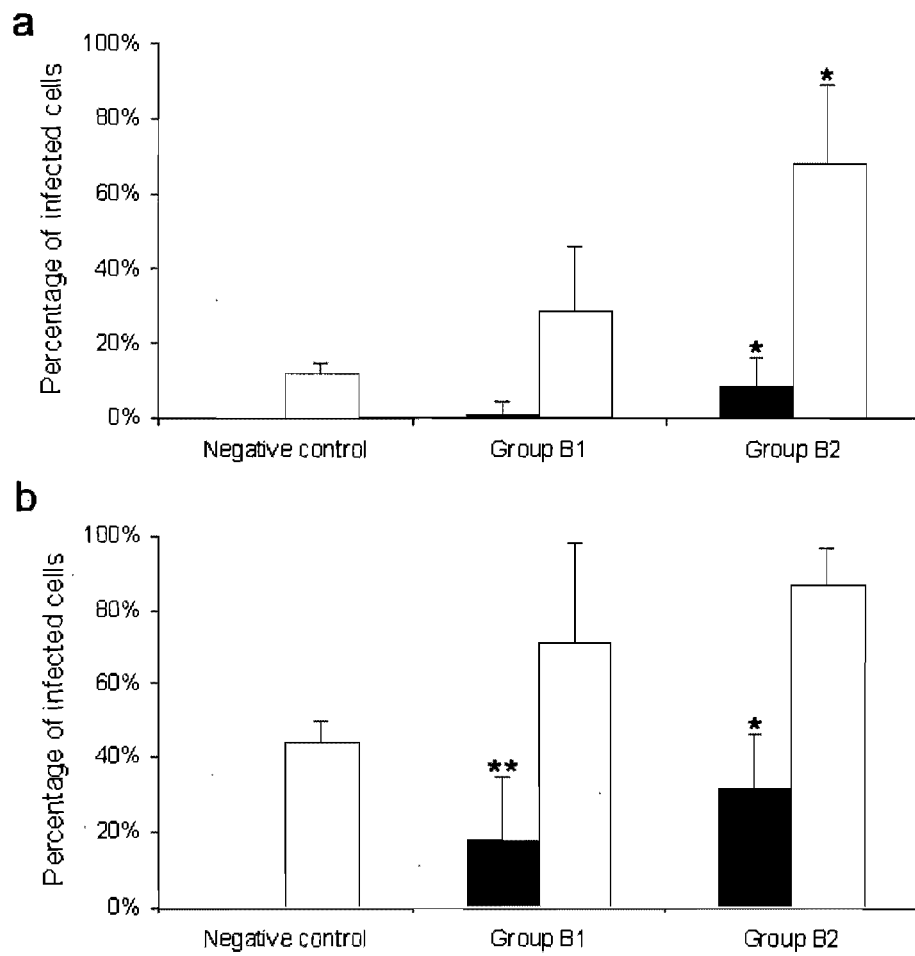


Figure 3.





**Figure 4.**

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

**Brïte Pauchet** : a conçu et réalisé toutes les expériences décrites dans l'article, à l'exception de la récolte des données sur les souches EPEC O45 d'origine porcine et de la mise au point de la biopuce à ADN, a compilé, analysé et interprété les résultats obtenus et a rédigé le manuscrit.

**Guillaume Bruant** : a conçu et réalisé les expériences reliées à la biopuce à ADN.

**Josée Harel** : a supervisé les travaux de Guillaume Bruant, et a contribué par ses conseils et par sa lecture critique du manuscrit.

**John M. Fairbrother** : a supervisé les travaux de Brïte Pauchet, et a orienté l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections.

**Éric Nadeau** : a supervisé les travaux de Brïte Pauchet, et a orienté l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections.

## Discussion

Cette étude a permis la mise au point d'un modèle de culture cellulaire pour l'étude de l'adhésion des souches EPEC d'origine porcine. La culture cellulaire est d'utilisation aisée et permet de contrôler les conditions de culture. En comparaison, la culture d'organe *in vitro* est plus représentative des conditions *in vivo*, vu qu'elle renferme tous les intervenants cellulaires de la muqueuse. Le modèle IVOC reste cependant lourd à mettre en place et nécessite le sacrifice d'un animal.

La lignée IPEC-J2, issue de l'intestin d'un porcelet nouveau-né, est un outil de choix pour l'étude des pathogènes porcins (Schierack et al., 2006). D'une part, il s'agit d'un modèle homologue. D'autre part, les entérocytes sont les premières cellules ciblées par les EPEC, ce qui fait que la lignée IPEC-J2 est la plus appropriée pour l'étude des pathogènes intestinaux porcins. Les cellules IPEC-J2 possèdent différentes caractéristiques propres aux entérocytes : elles sont polarisées grâce à la présence de jonctions intercellulaires et leur membrane apicale est garnie de microvillosités (Schierack et al., 2006). Ces cellules sont donc les plus à même de posséder les différents récepteurs pour les adhésines des EPEC d'origine porcine.

Il est important de souligner que toutes les souches EPEC O45 d'origine porcine utilisées dans cette étude adhéraient intimement à cette lignée. L'adhérence des souches EPEC était nettement supérieure à celle de la souche non-EPEC ECL3463, qui a servi de contrôle négatif pour l'adhérence. Ce résultat est important car, dans la majorité des publications ayant trait aux EPEC d'origine porcine, ces souches n'adhèrent que faiblement ou pas du tout aux cellules classiquement utilisées que sont les lignées HEP-2 ou HeLa (Malik et al., 2006; Zhu et al., 1994). Il est vrai que ces lignées sont d'origine humaine et il est probable qu'elles ne possèdent pas les récepteurs spécifiques nécessaires à l'adhésion des EPEC d'origine porcine.

Grâce à la microscopie électronique, nous avons pu observer que toutes les souches de notre collection produisaient des lésions A/E sur les cellules IPEC-J2. Ces lésions sont similaires à celles décrites pour les souches EPEC d'origine humaine, que ce soit sur biopsie d'intestin (Knutton et al., 1987b), sur cellules HEp-2 (Knutton et al., 1987a) ou Caco-2 (Knutton et al., 1989). Elles sont également similaires à celles décrites sur les entérocytes d'IVOC d'iléon ou de porcelets axéniques lors d'infection par les EPEC d'origine porcine (Girard et al., 2005a; Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994). Plusieurs souches induisent la formation d'un piédestal faisant extrusion à la surface apicale des cellules IPEC-J2, ce qui n'a pas été observé dans la ligne PK15, issue du rein de porc (Malik et al., 2006), et rarement dans le modèle IVOC (Girard et al., 2005a; Zhu et al., 1995). Nous avons également observé l'internalisation de certaines souches au sein de vacuoles intracytoplasmiques, ce qui n'a pas non plus été observé dans la lignée PK15 (Malik et al., 2006).

Une des souches étudiée ici dans le modèle cellulaire est la souche ECL2076 (anciennement 87-4725) qui a servi à définir les premières étapes de l'attachement et effacement dans un modèle *in vivo* de porcelets axéniques (Hélie et al., 1991). Cette souche, isolée d'un cas de diarrhée post-sevrage en 1987, appartient au phylogroupe B2 et induit expérimentalement de la diarrhée 66 h après inoculation. Les bactéries colonisent de façon très intense le duodénum et le caecum 72 heures après inoculation. À ce niveau, certaines sont internalisées dans des vacuoles intracytoplasmiques à l'intérieur des entérocytes. D'autres bactéries envahissent la *lamina propria* et les chylifères attenants, entraînant une inflammation modérée. Dans notre étude, la souche ECL2076 s'est également retrouvée dans des vacuoles intracytoplasmiques et ce, après seulement 8 h d'infection. Cette différence de délai peut facilement s'expliquer par le fait que, dans le cas de la culture cellulaire, les bactéries sont directement en contact avec les entérocytes, alors qu'*in vivo*, il leur faut

suivre le transit intestinal puis passer au travers de la couche de mucus qui protège la muqueuse.

Les souches de la collection d'EPEC de sérotype O45 que nous avons étudiées sont réparties dans deux des quatre groupes phylogénétiques d'Ochman, les groupes B1 et B2 (Ochman et Selander, 1984). Trois virotypes appartiennent au phylogroupe B1, les virotypes Eae: east1:paa, Eae: east1:paa:tsh et Eae: east1:paa:aida, et deux au phylogroupe B2, les virotypes Eae: east1:aida et Eae: aida.

L'utilisation de la culture cellulaire nous a permis d'observer une différence dans le pourcentage de cellules infectées par ces deux phylogroupes. Comme observé après 4 h d'incubation, les souches du groupe B2 adhèrent plus rapidement que les souches du groupe B1. Cette différence est sans doute liée à la différence de facteurs de virulence présents chez ces souches. Des études ultérieures seront nécessaires pour déterminer l'implication exacte des différents facteurs dans ce phénomène.

L'utilisation de la culture cellulaire nous a également permis d'établir que les souches EPEC d'origine porcine adhèrent aux cellules selon différents patrons d'adhérence. C'est la première fois que cela est décrit dans la littérature. Les EPEC O45 d'origine porcine adhèrent suivant les mêmes patrons d'adhérence que ceux répertoriés pour les EPEC d'origine humaine, c'est-à-dire l'adhérence localisée (LA), l'adhérence similaire à l'adhérence localisée (LAL) et l'adhérence diffuse (DA) (Scaletsky et al., 1999; Scaletsky et al., 1984; Trabulsi et al., 2002). Bien qu'aucune des souches de la collection ne possède le facteur EAF, trois souches présentaient un patron LA après 4 heures d'incubation. Cela n'avait jamais été observé pour des souches d'origine porcine. Chez les souches d'origine humaine, le patron LA est associé aux facteurs EAF et BFP (Nataro et Kaper, 1998). Nous avons donc voulu savoir si les souches porcines présentant le patron LA possédaient le facteur BFP. Parmi la collection de 27 souches, six possèdent le gène *bfpA*. Cependant, seules deux d'entre elles

présentaient le patron LA, la troisième souche présentant ce patron était négative pour *bfpA*. Il ne semble donc pas y avoir d'association entre la présence de ce gène et le patron LA pour les souches EPEC O45 d'origine porcine. De plus nous n'avons pu établir aucune association claire entre ce patron et un déterminant génétique présent sur la biopuce, le peu de souches concernées ne nous permettant aucune conclusion à ce sujet.

Un des intérêt de ce travail est que certaines des souches étudiées en modèle de culture cellulaire ont précédemment été utilisées dans les modèles *in vivo* et IVOC (Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994; Zhu et al., 1995).

Tout d'abord, cinq de ces souches ont servi à l'étude des premières étapes de l'adhérence et de la formation de lésions A/E en modèle IVOC (Zhu et al., 1995). La culture d'organe a été produite à partir de l'iléon de porcelet nouveau-né. Les souches appartenaient à deux groupes phylogénétiques et quatre virotypes. Les résultats de l'évolution de l'adhérence au cours du temps sont résumés dans le Tableau II.

Tableau II : Suivi de l'évolution des lésions A/E sur IVOC d'intestin de porcelet au cours du temps par microscopie optique. Tiré de Zhu et al., 1995.

Phylo groupe	Virotipe	Attachement à la muqueuse intestinale (heures post-inoculation)				
		2h	4h	6h	8h	10h
B1	Eae:east1:paa:tsh	±	+	+	+++	+++
B1	Eae:east1:paa	±	+	++	+++	+++
B2	Eae:east1:aida	-	-	+	++	+++
B2	Eae:aida	-	±	+	++	+++

Légende : - pas d'adhérence ; ± rares zones d'adhérence; + zones d'adhérence dispersées ; ++ larges zones d'adhérence ; +++ adhérence étendue.

Dans l'étude en IVOC, l'examen des lésions au microscope optique a permis d'évaluer l'adhérence des EPEC à la muqueuse. Les lésions A/E ont été confirmées par examen au microscope électronique pour les échantillons prélevés 6 et 8 heures après inoculation. Les deux souches du phylogroupe B1 adhéraient à la muqueuse après 2 heures d'incubation. L'adhérence des souches augmentait avec le temps d'incubation, pour se stabiliser à 8 heures post-inoculation. Les trois souches du phylogroupe B2 adhéraient plus tardivement à la muqueuse que les deux souches du groupe B1, les premières lésions n'étant observées que 4 à 5 heures après inoculation. Cependant l'intensité des lésions était équivalente pour toutes les souches à la fin de l'expérimentation. L'augmentation de l'adhérence au cours du temps a également été observée dans notre étude sur culture cellulaire. Cependant, dans ce modèle, les souches du groupe B2 montraient de meilleures propriétés d'adhérence à 4 et à 8 heures d'incubation que les souches du groupe B1.

La différence de résultats observée entre l'IVOC et la culture cellulaire peut être due à la différence de modèle expérimental et aux différences de conditions de préparation des souches. La culture cellulaire n'est constituée que d'un seul type cellulaire, les entérocytes, alors que l'IVOC contient tous les intervenants présents dans la muqueuse, c'est-à-dire les entérocytes, mais aussi les cellules à mucus, les cellules M et certains intervenants de l'immunité innée. Aussi, l'IVOC étant une biopsie d'intestin, les cellules épithéliales sont totalement différenciées, chose qui n'est jamais acquise pour une lignée cellulaire. Donc, somme toute, le modèle de culture cellulaire montre une bonne corrélation avec les résultats obtenus en IVOC et peut représenter une alternative et un complément intéressants à ce modèle pour étudier l'adhérence initiale.

Onze souches ont également été étudiées *in vivo* sur des porcelets axéniques (Zhu et al., 1994). Comme dans le modèle IVOC, ce sont les souches du phylogroupe B1 qui

étaient les plus pathogènes. En effet, pour ces souches, la diarrhée induite était plus précoce : 24 à 41 heures au lieu de 70 à 96 heures ou absence de diarrhée pour les souches du groupe B2. Les lésions A/E étaient plus étendues, avec un effacement plus important des microvillosités. Plus de 90% des villosités intestinales du caecum et de la portion proximale du côlon pouvaient être atteints. L'inflammation de la *lamina propria* était également plus importante, vu qu'elle était massivement infiltrée par les neutrophiles.

Il est également intéressant de remarquer que les souches du groupe B1 ont été isolées tout au long de la période d'échantillonnage. Les souches du groupe B2 ont disparu après 1998, alors que celles du groupe B1 restaient présentes jusqu'en 2004, fin de la période d'échantillonnage. Les souches du phylogroupe B1 de virotype Eae: east1:paa et Eae: east1:paa:tsh sont d'ailleurs encore isolées actuellement de cas de diarrhée post-sevrage au Québec (John Fairbrother, communication personnelle). Les souches du groupe B2 peuvent cependant toujours être présentes dans la population, sans toutefois provenir de cas de diarrhée. Chez l'homme, les EPEC atypiques du phylogroupe B2 sont d'ailleurs associés à la flore fécale d'enfants sains, alors que ceux du phylogroupe B1 sont plutôt isolés de cas de diarrhée (Afset et al., 2008).

Bien que, au sein de ces EPEC O45 d'origine porcine, les souches du groupe B1 semblent plus pathogènes *in vivo* que les souches du groupe B2, divers auteurs ont démontré le potentiel de virulence de ces souches (Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994). La différence de pathogénicité exprimée par les deux phylogroupes repose probablement sur des déterminants génétiques particuliers. La technologie de la biopuce à ADN (Bruant et al., 2006) nous a permis de découvrir des facteurs de virulence propres à certaines de ces souches et de les mettre en relation avec leur profil d'adhérence.



Toutes les souches possèdent le gène pour l'intimine, *eae*, pour son récepteur, *tir* et pour les différents effecteurs du SSTT. L'adhérence intime est sans doute donc liée au LEE, comme chez les autres EPEC. Toutes les souches sont du sous-type bêta d'intimine, ce sous-type est fréquemment retrouvé chez les souches porcines (Frohlicher et al., 2008; Krause et al., 2005; Malik et al., 2006; Vu-Khac et al., 2007). Les souches des deux groupes phylogénétiques possèdent un panel différent de gènes de virulence. Les souches du groupe B1 possèdent certains gènes reliés aux STEC : *efal*, *lpfA*<sub>O26</sub>, *paa* et *set* et d'autres reliés aux ExPEC : *fyuA*, *irp1*, *irp2*, *iss*, *lpfA*<sub>O113</sub> et *tsh*. Les souches du groupe B2, de leur côté, possèdent les gènes *aida1*, *ECs1282* et *rtx*, qui sont habituellement associés aux STEC. Au sein du groupe B2, les gènes, *fimA*, *iss* et *sepC* sont restreints au virotype Eae:east1:aida. Le gène *hlyA* est présent chez toutes les souches de virotype Eae:aida ainsi que dans une souche Eae:east1:aida et dans la seule souche Eae:paa:east1:aida. Différents variants des gènes *lpfA* et *nleA* se retrouvent dans les deux groupes phylogénétiques. Cette différence de facteurs de virulence peut jouer un rôle dans les propriétés d'adhérence des souches ainsi que dans leur persistance dans le temps.

Les gènes *efal* et *set/ent* sont présents chez toutes les souches du groupe B1. Chez les EPEC atypiques, ces gènes sont associés à la diarrhée infantile (Afset et al., 2006). Chez la souche STEC O157:H7 EDL933, ces deux gènes sont présents sur l'îlot de pathogénicité OI-122 (Perna et al., 2001). Cet îlot de pathogénicité est présent chez toutes les souches appartenant aux sérotypes les plus virulents des STEC et est fortement corrélé au cas les plus graves d'infection aux STEC, O157 ou non-O157, et au syndrome urémique et hémolytique (Karmali et al., 2003; Wickham et al., 2006). Cet îlot est également présent chez les EPEC. Par contre, il est absent du génome des autres pathotypes d'*E. coli* (Morabito et al., 2003). Il semble donc spécifique des AEEC. Chez certaines souches, il peut être physiquement lié au LEE pour former un îlot de pathogénicité en mosaïque. Morabito et collaborateurs ont démontré la

présence de l'îlot OI-122 dans la souche EPEC d'origine porcine ECL1001 (Morabito et al., 2003). Le gène *set/ent* code pour une protéine homologue de l'entérotoxine ShET2 de *Shigella flexneri* (Perna et al., 2001) alors que *efal* code pour la lymphostatine, une protéine qui a été impliquée dans l'adhérence ainsi que dans l'inhibition de la prolifération des lymphocytes (Klapproth et al., 1995; Klapproth et al., 2005). Vu que la lymphostatine module la réponse inflammatoire, elle pourrait jouer un rôle dans la différence de réponse inflammatoire générée par les souches des deux phylogroupes *in vivo*. De plus, ses propriétés d'adhésine pourraient favoriser l'adhésion initiale des souches du phylogroupe B1 *in vivo*, en IVOC et *in vitro*.

Le gène *paa*, pour porcine A/E-associated, a été initialement découvert en procédant à des insertions aléatoires du transposon *Tn<sub>phoA</sub>* dans le génome de la souche ECL1001 (An et al., 1999). La virulence des différents mutants a été testée en modèle IVOC. L'adhérence aux entérocytes de la souche mutante pour *paa* était significativement moindre que celle de la souche sauvage. De plus, le phénotype d'adhérence de la souche sauvage a été restauré par complémentation (Batisson et al., 2003). Le gène *paa* est présent chez certaines souches EPEC, STEC et ETEC (An et al., 1999; Leclerc et al., 2007). Il est par contre absent des souches non pathogènes d'*E. coli* (Batisson et al., 2003). Il a été associé à la diarrhée infantile due aux EPEC atypiques au même titre que l'îlot OI-122 (Afset et al., 2006). Ce facteur jouerait donc un rôle dans l'adhérence des souches EPEC d'origine porcine et pourrait être une nouvelle adhésine (Batisson et al., 2003). Suivant cette hypothèse, bien que les souches du phylogroupe B2 ne possèdent pas le facteur *paa*, elles démontrent de l'adhérence en culture cellulaire, en IVOC et *in vivo*. Elles pourraient cependant détenir un autre facteur de virulence aux propriétés comparables à Paa, ou utiliser d'autres adhésines, qui de ce fait utiliseraient des récepteurs différents. Cependant une étude récente a montré que la localisation de Paa chez les EPEC était périplasmique, ce qui peut être en contradiction avec un rôle d'adhésine, et que Paa

influençait la sécrétion dans la cellule hôte des différents effecteurs du SSTT, tels EspA, EspB et Tir. De plus, en utilisant le modèle mis au point dans cette étude, il a été possible de démontrer, par mutation et complémentation, que Paa favorisait l'adhésion de la souche ECL1001 aux cellules IPEC-J2 (Élodie Destable, communication personnelle, voir Annexe). Paa pourrait donc être impliqué dans l'adhésion et moduler la fonction du SSTT. Le facteur *paa* est présent dans toutes les souches du phylogroupe B1, plus pathogènes *in vivo*. Il pourrait donc avoir un rôle dans la pathogénicité de ces souches, par exemple en modulant l'expression de facteurs d'adhérence, comme il le fait avec EspA.

Les souches du phylogroupe B1 possèdent également certains gènes de virulence habituellement associés aux ExPEC. D'ailleurs, nous rapportons ici pour la première fois la présence du gène *tsh* au sein de souches EPEC d'origine porcine. Le gène *tsh* a été découvert chez les souches pathogènes aviaires (Provence et Curtiss, 1994). Il code pour une hémagglutinine sensible à la température faisant partie de la famille des autotransporteurs sérine protéase des *Enterobacteriaceae*, au même titre que les protéines EspC des EPEC et EspP des STEC (Brunder et al., 1997; Stathopoulos et al., 1999). La protéine EspP des STEC O157:H7 a été impliquée chez le bovin dans la colonisation intestinale et chez l'homme dans les hémorragies de la muqueuse lors de colite hémorragique (Brunder et al., 1997; Dziya et al., 2007). Tsh est identique à Hbp, une hémoglobine protéase d'*E. coli* (Dozois et al., 2000; Otto et al., 2002). Il a une activité protéolytique, étant capable de cliver la mucine et la caséine (Dutta et al., 2002; Kostakioti et Stathopoulos, 2004). De plus, diverses études ont démontré l'implication de Tsh dans la colonisation du tractus respiratoire lors de colibacillose aviaire (Dozois et al., 2000; Ngeleka et al., 2002). Comme la protéine Tsh purifiée est capable d'adhérer aux globules rouges et à certaines protéines de la matrice extracellulaire (Kostakioti et Stathopoulos, 2004), elle pourrait également jouer un rôle dans l'adhérence des souches EPEC d'origine porcine aux cellules épithéliales.

Le gène *malX* n'a aucun rôle direct connu dans la virulence des ExPEC. Cependant, dans certaines études, il est un meilleur marqueur de virulence que des facteurs reconnus tels les hémolysines (Johnson et al., 2002). Chez les souches porcines, il pourrait également avoir lui-même un rôle dans la virulence qui reste à ce jour inconnu, ou être un marqueur pour des facteurs de virulence non encore déterminés.

Les gènes *fyuA* et *irp* sont associés dans un îlot de pathogénicité chez *Yersinia pestis*, ainsi que chez les ExPEC, les EAEC, certains EPEC et chez les STEC non-O157 (Karch et al., 1999; Schubert et al., 1998). Ils codent pour un système d'acquisition du fer reliés à la yersiniabactine (Schubert et al., 1998). Chez les APEC, ces gènes sont fortement corrélés aux épisodes de colibacillose (Vandekerchove et al., 2005). Le gène *iss* est un homologue du gène *bor* du phage lambda. Il code pour une protéine de résistance au sérum (Chuba et al., 1989). Chez les souches aviaires, sa présence entraîne une forte augmentation de la virulence (Binns et al., 1982). De nombreuses études sur les APEC montrent l'implication de ce facteur dans la colibacillose associée ou non à de la septicémie (Nolan et al., 2003). Certaines souches EPEC O45 d'origine porcine ont démontré de l'internalisation bactérienne, *in vitro* dans la lignée IPEC-J2, mais aussi *in vivo* (Hélie et al., 1991; Zhu et al., 1994). Ces trois facteurs pourraient conférer un avantage sélectif à ces souches plus envahissantes pour s'approvisionner en fer et lutter contre le complément. La présence des gènes *fyuA* et *irp* pourrait également indiquer la présence de l'îlot de pathogénicité de *Y. pestis* dans les souches EPEC d'origine porcine.

Chaque groupe phylogénétique possède un sous-type différent des gènes *nleA* et de *lpfA*. Le facteur de virulence *nleA* a récemment été découvert dans un îlot de pathogénicité de la souche STEC O157:H7 (Gruenheid et al., 2004). Il est impliqué dans la virulence des souches AEEC, même si son rôle exact n'a pas encore été clarifié. Il est transloqué dans la cellule hôte via le SSTT (Gruenheid et al., 2004; Roe et al., 2007). Une fois dans la cellule hôte, il se localise dans l'appareil de Golgi et

interfère avec le transport intracellulaire et inhibe la sécrétion des protéines de la cellule hôte (Kim et al., 2007; Lee et al., 2008). À ce jour, quatorze variants ont été répertoriés chez les EPEC, les STEC et *C. rodentium* (Creuzburg et Schmidt, 2007; Gruenheid et al., 2004).

Les souches du phylogroupe B1 possèdent le variant *lpfA*<sub>O26</sub>, qui est identique à celui des EPEC du lapin, *lpfA*<sub>R141</sub>, et le variant *lpfA*<sub>O113</sub>, alors que les souches du phylogroupe B2 possèdent le variant *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub>. Les variants *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub> et *lpfA*<sub>O113</sub> se retrouvent également dans des souches différentes chez les STEC (Toma et al., 2004). Les variants du *lpfA* peuvent être impliqués dans l'adhérence initiale car ils codent pour la sous-unité majeure d'un fimbriae de type I. Le *lpfA*<sub>O26</sub> a d'ailleurs été incriminé dans les premières étapes de l'adhérence des souches EPEC du lapin et dans le développement de la diarrhée chez cet animal (Newton et al., 2004). Deux variants sont présents chez les STEC O157:H7, *lpfA*<sub>O157/OI-141</sub> et *lpfA*<sub>O157/OI-154</sub> (Torres et al., 2002; Torres et al., 2004). Tous deux seraient impliqués dans le tropisme tissulaire (Fitzhenry et al., 2006). Le variant *lpfA*<sub>O113</sub> a été découvert dans la souche STEC O113:H21, négative pour le LEE (Doughty et al., 2002). Diverses études ont établi le rôle des variants *LpfA*<sub>O113</sub> et *LpfA*<sub>O157/OI-141</sub> dans l'adhérence aux cellules eucaryotes (Doughty et al., 2002; Torres et al., 2002).

Les gènes de virulence *aida1*, *hlyA*, et *fepC* sont associés aux souches du phylogroupe B2. Toutes les souches de ce groupe possèdent le gène *rtx/z0615* qui code pour une exoprotéine supposée de la famille RTX. Il pourrait être un marqueur de l'îlot de pathogénicité des STEC O157:H7 OI-28 (Perna et al., 2001). Le gène *fepC* est présent uniquement chez les souches de virotype Eae:east1:aida. Il code pour une protéine membranaire impliquée dans le transport de fer par l'entérobactine (Pierce et Earhart, 1986; Shea et McIntosh, 1991).

Toutes les souches de virotype Eae:aida et une souche de virotype Eae:east1:aida possèdent le gène *hlyA*. L'hémolysine HlyA est présente chez les souches

uropathogènes et shiga-toxinogènes : elle est associée aux cas d'infections du tractus urinaire les plus graves et aux sérotypotypes STEC les plus virulents (Karmali et al., 2003; Wiles et al., 2008). À forte concentration, elle cause la lyse cellulaire, ce qui rendrait les nutriments accessibles aux bactéries. Cependant, en concentration plus physiologique, son rôle serait plutôt de moduler différentes voies de signalisation de l'hôte, comme celles impliquées dans la réponse inflammatoire (Taneike et al., 2002; Wiles et al., 2008). *In vivo*, les souches de virotype Eae:aida entraînent une réponse inflammatoire moins importante que celle des autres virotypes (Zhu et al., 1994). Il serait intéressant d'étudier l'implication de *hlyA* dans la modulation de la réponse inflammatoire lors des infections aux EPEC d'origine porcine.

Toutes les souches du phylogroupe B2 possèdent le gène *aida1*. Ce gène a été découvert sur le plasmide d'une souche EPEC O126:H27 isolée d'un cas de diarrhée infantile. Cette souche démontrait de l'adhérence diffuse sur les cellules HeLa (Benz et Schmidt, 1989). L'adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse, AIDA-I, est une protéine autotransportrice de la membrane externe (Benz et Schmidt, 1992; Suhr et al., 1996). Chez le porc, *aida1* est fréquemment isolé de cas de diarrhée due aux EPEC ou aux ETEC (Ngeleka et al., 2003) et contribuerait à la colonisation de l'intestin, à l'auto-agrégation des bactéries et à leur protection par un biofilm (Charbonneau et Mourez, 2007; Ravi et al., 2007). Chez les EPEC O45 d'origine porcine, le patron DA est plus fréquemment associé aux souches du phylogroupe B2 qu'à celles du groupe B1. Dans ces souches, *aida1* pourrait intervenir dans le phénotype d'adhérence. Des travaux supplémentaires sont nécessaires pour valider cette hypothèse.

## Conclusion

En conclusion, cette étude a démontré l'efficacité de la lignée IPEC-J2 pour l'étude des EPEC O45 d'origine porcine et a apporté de nouvelles informations sur l'adhérence de ces souches. Ce modèle peut également être utilisé pour étudier l'interaction des EPEC porcins appartenant à d'autres sérogroupes avec les cellules épithéliales intestinales. Il peut aussi servir à l'étude d'autres pathogènes du porc, par exemple les autres pathotypes d'*E. coli*, *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, ou les virus à tropisme intestinal tels les coronavirus ou les rotavirus.

Cette étude a apporté un aperçu général des facteurs de virulence présents parmi les EPEC O45 d'origine porcine et a montré que des déterminants génétiques différents au sein de ces souches entraînent une différence dans la pathogénicité, *in vitro* et *in vivo*. Certains de ces facteurs, tels les adhésines, pourraient être ciblés lors d'études plus poussées. Comme ce qui a été fait pour le facteur *paa*, une étude par mutation et complémentation pourrait éclaircir l'implication d'autres déterminants dans l'adhérence des souches. Il faudrait, pour cela, déterminer les conditions dans lesquelles ces facteurs sont exprimés, quelles sont leurs voies de régulation, et voir, par exemple, si ces facteurs sont exprimés différemment au cours de l'infection. Il serait également intéressant de déterminer quels sont les récepteurs cellulaires de ces adhésines potentielles, tant sur la lignée IPEC-J2 que sur tissu intestinal, *in vivo* ou en IVOC. Ces études permettraient éventuellement de trouver un mécanisme efficace pour inhiber l'adhérence initiale des EPEC et donc, éviter la diarrhée et les pertes économiques associées.

Une autre voie pourrait être de déterminer quelles sont les adhésines particulières aux souches porcines qui permettent leur adhésion en modèle homologue et non en modèle hétérologue. Enfin, une étude sur le ou les facteurs entraînant la différence de virulence des souches du phylogroupe B1 *in vitro* et *in*

*vivo* pourrait mettre à jour de nouveaux effecteurs impliqués dans la résistance aux défenses non spécifiques de l'intestin.



## Bibliographie

- Adu-Bobie, J., Frankel, G., Bain, C., Goncalves, A.G., Trabulsi, L.R., Douce, G., Knutton, S., Dougan, G., 1998, Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* 36, 662-668.
- Afset, J.E., Anderssen, E., Bruant, G., Harel, J., Wieler, L., Bergh, K., 2008, Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2280-2290.
- Afset, J.E., Bruant, G., Brousseau, R., Harel, J., Anderssen, E., Bevanger, L., Bergh, K., 2006, Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic *Escherichia coli* by DNA microarray analysis and PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44, 3703-3711.
- Aktan, I., Sprigings, K.A., La Ragione, R.M., Faulkner, L.M., Paiba, G.A., Woodward, M.J., 2004, Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Vet. Microbiol.* 102, 43-53.
- An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Harel, J., 1999, Distribution of a novel locus called *Paa* (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv. Exp. Med. Biol.* 473, 179-184.
- An, H., Fairbrother, J.M., Dubreuil, J.D., Harel, J., 1997, Cloning and characterization of the *eae* gene from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. *FEMS Microbiol. Lett.* 148, 239-245.
- Batisson, I., Guimond, M.P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M., Jacques, M., Harel, J., 2003, Characterization of the novel factor *paa*

- involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. Infect. Immun. 71, 4516-4525.
- Bäumler, A.J., Heffron, F., 1995, Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. 177, 2087-2097.
- Bäumler, A.J., Tsois, R.M., Heffron, F., 1996, The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 93, 279-283.
- Benz, I., Schmidt, M.A., 1989, Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 57, 1506-1511.
- Benz, I., Schmidt, M.A., 1992, Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27). Infect. Immun. 60, 13-18.
- Berger, C.N., Crepin, V.F., Jepson, M.A., Arbeloa, A., Frankel, G., 2009, The mechanisms used by enteropathogenic *Escherichia coli* to control filopodia dynamics. Cell Microbiol 11, 309-322.
- Bettelheim, K.A., 1994, Biochemical Characteristics of *Escherichia coli*, In: Gyles, C.L. (Ed.) *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford, pp. 3-30.
- Beutin, L., Marches, O., Bettelheim, K.A., Gleier, K., Zimmermann, S., Schmidt, H., Oswald, E., 2003, HEp-2 cell adherence, actin aggregation, and intimin types of attaching and effacing *Escherichia coli* strains isolated from healthy infants in Germany and Australia. Infect. Immun. 71, 3995-4002.

- Binns, M.M., Mayden, J., Levine, R.P., 1982, Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV,I-K94. *Infect. Immun.* 35, 654-659.
- Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Mora, A., Dahbi, G., Coira, M.A., Blanco, J., 2004, Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from human patients: prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *J. Clin. Microbiol.* 42, 311-319.
- Boerlin, P., 2004, Evolution of Bacterial Virulence, In: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (Eds.) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 13-22.
- Brown, D.R., Price, L.D., 2007, Characterization of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 invasion in an epithelial cell line (IPEC J2) from porcine small intestine. *Vet. Microbiol.* 120, 328-333.
- Bruant, G., Maynard, C., Bekal, S., Gaucher, I., Masson, L., Brousseau, R., Harel, J., 2006, Development and validation of an oligonucleotide microarray for detection of multiple virulence and antimicrobial resistance genes in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3780-3784.
- Brunder, W., Schmidt, H., Karch, H., 1997, EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* 24, 767-778.
- Campellone, K.G., Robbins, D., Leong, J.M., 2004, EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* 7, 217-228.

- Charbonneau, M.E., Mourez, M., 2007, Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J. Bacteriol.* 189, 9020-9029.
- Chen, H.D., Frankel, G., 2005, Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* 29, 83-98.
- China, B., Pirson, V., Mainil, J., 1998, Prevalence and molecular typing of attaching and effacing *Escherichia coli* among calf populations in Belgium. *Vet. Microbiol.* 63, 249-259.
- Chuba, P.J., Leon, M.A., Banerjee, A., Palchaudhuri, S., 1989, Cloning and DNA sequence of plasmid determinant *iss*, coding for increased serum survival and surface exclusion, which has homology with lambda DNA. *Mol. Gen. Genet.* 216, 287-292.
- Cleary, J., Lai, L.C., Shaw, R.K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M.S., Frankel, G., Knutton, S., 2004, Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150, 527-538.
- Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E., 2000, Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 4555-4558.
- Cookson, A.L., Bennett, J., Thomson-Carter, F., Attwood, G.T., 2007, Intimin subtyping of *Escherichia coli*: concomitant carriage of multiple intimin subtypes from forage-fed cattle and sheep. *FEMS Microbiol. Lett.* 272, 163-171.
- Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe, B., 1979, An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* 3, 95-99.

- Creuzburg, K., Schmidt, H., 2007, Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector *nleA* family among pathogenic *Escherichia coli* strains. *J. Clin. Microbiol.* 45, 2498-2507.
- Dean, P., Kenny, B., 2009, The effector repertoire of enteropathogenic *E. coli*: ganging up on the host cell. *Curr. Opin. Microbiol.* 12, 101-109.
- Doughty, S., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Robertson, M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L., 2002, Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 70, 6761-6769.
- Dozois, C.M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Curtiss, R., 3rd, 2000, Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect. Immun.* 68, 4145-4154.
- Drago-Serrano, M.E., Parra, S.G., Manjarrez-Hernandez, H.A., 2006, EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol. Lett.* 265, 35-40.
- Dulguer, M.V., Fabbriotti, S.H., Bando, S.Y., Moreira-Filho, C.A., Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C., 2003, Atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains: phenotypic and genetic profiling reveals a strong association between enteroaggregative *E. coli* heat-stable enterotoxin and diarrhea. *J. Infect. Dis.* 188, 1685-1694.
- Dutta, P.R., Cappello, R., Navarro-Garcia, F., Nataro, J.P., 2002, Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect. Immun.* 70, 7105-7113.

- Dziva, F., Mahajan, A., Cameron, P., Currie, C., McKendrick, I.J., Wallis, T.S., Smith, D.G., Stevens, M.P., 2007, EspP, a Type V-secreted serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, influences intestinal colonization of calves and adherence to bovine primary intestinal epithelial cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 271, 258-264.
- Echtenkamp, F., Deng, W., Wickham, M.E., Vazquez, A., Puente, J.L., Thanabalasuriar, A., Gruenheid, S., Finlay, B.B., Hardwidge, P.R., 2008, Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 98-107.
- Fagundes-Neto, U., Scaletsky, I.C., 2000, The gut at war: the consequences of enteropathogenic *Escherichia coli* infection as a factor of diarrhea and malnutrition. *Sao Paulo Med J* 118, 21-29.
- Fairbrother, J.M., Nadeau, E. 2008. Virulence Factors and Serogroups. <http://www.ecl-lab.com/fr/ecoli/virulence.asp>
- Fitzhenry, R., Dahan, S., Torres, A.G., Chong, Y., Heuschkel, R., Murch, S.H., Thomson, M., Kaper, J.B., Frankel, G., Phillips, A.D., 2006, Long polar fimbriae and tissue tropism in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbes Infect* 8, 1741-1749.
- Frankel, G., Candy, D.C., Everest, P., Dougan, G., 1994, Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect. Immun.* 62, 1835-1842.
- Frankel, G., Phillips, A.D., 2008, Attaching effacing *Escherichia coli* and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal. *Cell Microbiol* 10, 549-556.

- Frohlicher, E., Krause, G., Zweifel, C., Beutin, L., Stephan, R., 2008, Characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) isolated from pigs and sheep. *BMC Microbiol* 8, 144.
- Garcia-Angulo, V.A., Deng, W., Thomas, N.A., Finlay, B.B., Puente, J.L., 2008, Regulation of expression and secretion of NleH, a new non-locus of enterocyte effacement-encoded effector in *Citrobacter rodentium*. *J. Bacteriol.* 190, 2388-2399.
- Garmendia, J., Frankel, G., Crepin, V.F., 2005, Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect. Immun.* 73, 2573-2585.
- Garmendia, J., Phillips, A.D., Carlier, M.F., Chong, Y., Schuller, S., Marches, O., Dahan, S., Oswald, E., Shaw, R.K., Knutton, S., Frankel, G., 2004, TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* 6, 1167-1183.
- Gill, R.K., Borthakur, A., Hodges, K., Turner, J.R., Clayburgh, D.R., Saksena, S., Zaheer, A., Ramaswamy, K., Hecht, G., Dudeja, P.K., 2007, Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl/OH exchange following infection with enteropathogenic *E. coli*. *J. Clin. Invest.* 117, 428-437.
- Girard, F., Batisson, I., Frankel, G.M., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2005, Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. *Infect. Immun.* 73, 6005-6016.
- Girard, F., Oswald, I.P., Taranu, I., Helie, P., Appleyard, G.D., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2005, Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. *Infect. Immun.* 73, 5514-5523.

- Giron, J.A., Torres, A.G., Freer, E., Kaper, J.B., 2002, The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* 44, 361-379.
- Gruenheid, S., Sekirov, I., Thomas, N.A., Deng, W., O'Donnell, P., Goode, D., Li, Y., Frey, E.A., Brown, N.F., Metalnikov, P., Pawson, T., Ashman, K., Finlay, B.B., 2004, Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol. Microbiol.* 51, 1233-1249.
- Gyles, C.L., Fairbrother, J.M., 2004, *Escherichia coli*, In: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (Eds.) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 193-223.
- Gyles, C.L., Prescott, J.F., 2004, Themes in Bacterial Pathogenic Mechanisms, In: Gyles, C.L., Prescott, J.F., Songer, J.G., Thoen, C.O. (Eds.) *Pathogenesis of Bacterial Infections in Animals*. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 3-12.
- Hélie, P., Morin, M., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1991, Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infect. Immun.* 59, 814-821.
- Hemrajani, C., Marches, O., Wiles, S., Girard, F., Dennis, A., Dziva, F., Best, A., Phillips, A.D., Berger, C.N., Mousnier, A., Crepin, V.F., Kruidenier, L., Woodward, M.J., Stevens, M.P., La Ragione, R.M., MacDonald, T.T., Frankel, G., 2008, Role of NleH, a type III secreted effector from attaching and effacing pathogens, in colonization of the bovine, ovine, and murine gut. *Infect. Immun.* 76, 4804-4813.
- Hernandes, R.T., Silva, R.M., Carneiro, S.M., Salvador, F.A., Fernandes, M.C., Padovan, A.C., Yamamoto, D., Mortara, R.A., Elias, W.P., da Silva Briones, M.R., Gomes, T.A., 2008, The localized adherence pattern of an atypical



- enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. *Cell Microbiol* 10, 415-425.
- Hernandes, R.T., Vieira, M.A., Carneiro, S.M., Salvador, F.A., Gomes, T.A., 2006, Characterization of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* strains that express typical localized adherence in HeLa cells in the absence of the bundle-forming pilus. *J. Clin. Microbiol.* 44, 4214-4217.
- Higgins, R.J., Pearson, G.R., Wray, C., 1997, Attaching and effacing *E. coli*. Microscopic and ultrastructural observation of intestinal infections in pigs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 412, 59-62.
- Hyland, R.M., Sun, J., Griener, T.P., Mulvey, G.L., Klassen, J.S., Donnenberg, M.S., Armstrong, G.D., 2008, The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an *N*-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol* 10, 177-187.
- Iizumi, Y., Sagara, H., Kabe, Y., Azuma, M., Kume, K., Ogawa, M., Nagai, T., Gillespie, P.G., Sasakawa, C., Handa, H., 2007, The enteropathogenic *E. coli* effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function. *Cell Host Microbe* 2, 383-392.
- Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C., Joly, B., 1994, Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res. Microbiol.* 145, 621-632.
- Janke, B.H., Francis, D.H., Collins, J.E., Libal, M.C., Zeman, D.H., Johnson, D.D., 1989, Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1, 6-11.
- Johnson, J.R., Kuskowski, M.A., O'Bryan, T.T., Maslow, J.N., 2002, Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among

- Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *J. Infect. Dis.* 185, 1439-1447.
- Jordan, D.M., Cornick, N., Torres, A.G., Dean-Nystrom, E.A., Kaper, J.B., Moon, H.W., 2004, Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 in vivo. *Infect. Immun.* 72, 6168-6171.
- Jores, J., Rumer, L., Wieler, L.H., 2004, Impact of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island on the evolution of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 294, 103-113.
- Kanack, K.J., Crawford, J.A., Tatsuno, I., Karmali, M.A., Kaper, J.B., 2005, SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system. *Infect. Immun.* 73, 4327-4337.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004, Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.
- Karch, H., Schubert, S., Zhang, D., Zhang, W., Schmidt, H., Olschlager, T., Hacker, J., 1999, A genomic island, termed high-pathogenicity island, is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 67, 5994-6001.
- Karmali, M.A., Mascarenhas, M., Shen, S., Ziebell, K., Johnson, S., Reid-Smith, R., Isaac-Renton, J., Clark, C., Rahn, K., Kaper, J.B., 2003, Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4930-4940.
- Kelly, M., Hart, E., Mundy, R., Marches, O., Wiles, S., Badea, L., Luck, S., Tauschek, M., Frankel, G., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L., 2006,

- Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by *Citrobacter rodentium*. *Infect. Immun.* 74, 2328-2337.
- Khursigara, C., Abul-Milh, M., Lau, B., Giron, J.A., Lingwood, C.A., Barnett Foster, D.E., 2001, Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. *Infect. Immun.* 69, 6573-6579.
- Kim, J., Thanabalasuriar, A., Chaworth-Musters, T., Fromme, J.C., Frey, E.A., Lario, P.I., Metalnikov, P., Rizg, K., Thomas, N.A., Lee, S.F., Hartland, E.L., Hardwidge, P.R., Pawson, T., Strynadka, N.C., Finlay, B.B., Schekman, R., Gruenheid, S., 2007, The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function. *Cell Host Microbe* 2, 160-171.
- Klapproth, J.M., Donnenberg, M.S., Abraham, J.M., Mobley, H.L., James, S.P., 1995, Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphocyte activation and lymphokine production. *Infect. Immun.* 63, 2248-2254.
- Klapproth, J.M., Sasaki, M., Sherman, M., Babbin, B., Donnenberg, M.S., Fernandes, P.J., Scaletsky, I.C., Kalman, D., Nusrat, A., Williams, I.R., 2005, *Citrobacter rodentium* *lifA/efal* is essential for colonic colonization and crypt cell hyperplasia *in vivo*. *Infect. Immun.* 73, 1441-1451.
- Knutton, S., Baldini, M.M., Kaper, J.B., McNeish, A.S., 1987, Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 55, 78-85.
- Knutton, S., Baldwin, T., Williams, P.H., McNeish, A.S., 1989, Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57, 1290-1298.

- Knutton, S., Lloyd, D.R., McNeish, A.S., 1987, Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* 55, 69-77.
- Knutton, S., Phillips, A.D., Smith, H.R., Gross, R.J., Shaw, R., Watson, P., Price, E., 1991, Screening for enteropathogenic *Escherichia coli* in infants with diarrhea by the fluorescent-actin staining test. *Infect. Immun.* 59, 365-371.
- Koh, S.Y., George, S., Brozel, V., Moxley, R., Francis, D., Kaushik, R.S., 2008, Porcine intestinal epithelial cell lines as a new in vitro model for studying adherence and pathogenesis of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet. Microbiol.* 130, 191-197.
- Kostakioti, M., Stathopoulos, C., 2004, Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 72, 5548-5554.
- Krause, G., Zimmermann, S., Beutin, L., 2005, Investigation of domestic animals and pets as a reservoir for intimin- (eae) gene positive *Escherichia coli* types. *Vet. Microbiol.* 106, 87-95.
- Kuehn, M.J., Heuser, J., Normark, S., Hultgren, S.J., 1992, P pili in uropathogenic *E. coli* are composite fibres with distinct fibrillar adhesive tips. *Nature* 356, 252-255.
- Le Bouguéneq, C., 2005, Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.* 295, 471-478.
- Leclerc, S., Boerlin, P., Gyles, C., Dubreuil, J.D., Mourez, M., Fairbrother, J.M., Harel, J., 2007, *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res. Microbiol.* 158, 97-104.

- Lee, S.F., Kelly, M., McAlister, A., Luck, S.N., Garcia, E.L., Hall, R.A., Robins-Browne, R.M., Frankel, G., Hartland, E.L., 2008, A C-terminal class I PDZ binding motif of EspI/NleA modulates the virulence of attaching and effacing *Escherichia coli* and *Citrobacter rodentium*. *Cell Microbiol* 10, 499-513.
- Levine, M.M., Bergquist, E.J., Nalin, D.R., Waterman, D.H., Hornick, R.B., Young, C.R., Sotman, S., 1978, *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* 1, 1119-1122.
- Li, Q., Zhang, Q., Wang, C., Li, N., Li, J., 2008, Invasion of enteropathogenic *Escherichia coli* into host cells through epithelial tight junctions. *FEBS J* 275, 6022-6032.
- Ma, C., Wickham, M.E., Guttman, J.A., Deng, W., Walker, J., Madsen, K.L., Jacobson, K., Vogl, W.A., Finlay, B.B., Vallance, B.A., 2006, *Citrobacter rodentium* infection causes both mitochondrial dysfunction and intestinal epithelial barrier disruption in vivo: role of mitochondrial associated protein (Map). *Cell Microbiol* 8, 1669-1686.
- Malik, A., Toth, I., Beutin, L., Schmidt, H., Taminiou, B., Dow, M.A., Morabito, S., Oswald, E., Mainil, J., Nagy, B., 2006, Serotypes and intimin types of intestinal and faecal strains of *eaec+* *Escherichia coli* from weaned pigs. *Vet. Microbiol.* 114, 82-93.
- Marches, O., Covarelli, V., Dahan, S., Cougoule, C., Bhatta, P., Frankel, G., Caron, E., 2008, EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* inhibits opsono-phagocytosis. *Cell Microbiol* 10, 1104-1115.
- Martins, M.F., Martinez-Rossi, N.M., Ferreira, A., Brocchi, M., Yano, T., Castro, A.F., Silveira, W.D., 2000, Pathogenic characteristics of *Escherichia coli* strains isolated from newborn piglets with diarrhea in Brazil. *Vet. Microbiol.* 76, 51-59.

- McDaniel, T.K., Jarvis, K.G., Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., 1995, A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92, 1664-1668.
- Moon, H.W., Hoffman, L.J., Cornick, N.A., Booher, S.L., Bosworth, B.T., 1999, Prevalences of some virulence genes among *Escherichia coli* isolates from swine presented to a diagnostic laboratory in Iowa. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11, 557-560.
- Moon, H.W., Whipp, S.C., Argenzio, R.A., Levine, M.M., Giannella, R.A., 1983, Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* 41, 1340-1351.
- Morabito, S., Tozzoli, R., Oswald, E., Caprioli, A., 2003, A mosaic pathogenicity island made up of the locus of enterocyte effacement and a pathogenicity island of *Escherichia coli* O157:H7 is frequently present in attaching and effacing *E. coli*. *Infect. Immun.* 71, 3343-3348.
- Moreira, C.G., Palmer, K., Whiteley, M., Sircili, M.P., Trabulsi, L.R., Castro, A.F., Sperandio, V., 2006, Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188, 3952-3961.
- Mossman, K.L., Mian, M.F., Lauzon, N.M., Gyles, C.L., Lichty, B., Mackenzie, R., Gill, N., Ashkar, A.A., 2008, Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *J. Immunol.* 181, 6702-6706.
- Mundy, R., MacDonald, T.T., Dougan, G., Frankel, G., Wiles, S., 2005, *Citrobacter rodentium* of mice and man. *Cell Microbiol* 7, 1697-1706.
- Muza-Moons, M.M., Schneeberger, E.E., Hecht, G.A., 2004, Enteropathogenic *Escherichia coli* infection leads to appearance of aberrant tight junctions strands in the lateral membrane of intestinal epithelial cells. *Cell Microbiol* 6, 783-793.

- Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998, Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11, 142-201.
- Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M.M., 1987, Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. Pediatr. Infect. Dis. J. 6, 829-831.
- Navarro-Garcia, F., Canizalez-Roman, A., Sui, B.Q., Nataro, J.P., Azamar, Y., 2004, The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. Infect. Immun. 72, 3609-3621.
- Neef, N.A., McOrist, S., Lysons, R.J., Bland, A.P., Miller, B.G., 1994, Development of large intestinal attaching and effacing lesions in pigs in association with the feeding of a particular diet. Infect. Immun. 62, 4325-4332.
- Newton, H.J., Sloan, J., Bennett-Wood, V., Adams, L.M., Robins-Browne, R.M., Hartland, E.L., 2004, Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 72, 1230-1239.
- Ngeleka, M., Brereton, L., Brown, G., Fairbrother, J.M., 2002, Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*-, and *iuc*-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissues and the cloacae of broilers. Avian Dis. 46, 143-152.
- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D.M., Fairbrother, J.M., 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, 242-252.
- Nicolas-Chanoine, M.H., Blanco, J., Leflon-Guibout, V., Demarty, R., Alonso, M.P., Canica, M.M., Park, Y.J., Lavigne, J.P., Pitout, J., Johnson, J.R., 2008,

- Intercontinental emergence of *Escherichia coli* clone O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J. Antimicrob. Chemother.* 61, 273-281.
- Nolan, L.K., Horne, S.M., Giddings, C.W., Foley, S.L., Johnson, T.J., Lynne, A.M., Skyberg, J., 2003, Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Vet. Res. Commun.* 27, 101-110.
- Nougayrède, J.P., Donnenberg, M.S., 2004, Enteropathogenic *Escherichia coli* EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway. *Cell Microbiol* 6, 1097-1111.
- Nougayrède, J.P., Fernandes, P.J., Donnenberg, M.S., 2003, Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* 5, 359-372.
- Ochman, H., Selander, R.K., 1984, Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* 157, 690-693.
- Ogura, Y., Ooka, T., Whale, A., Garmendia, J., Beutin, L., Tennant, S., Krause, G., Morabito, S., Chinen, I., Tobe, T., Abe, H., Tozzoli, R., Caprioli, A., Rivas, M., Robins-Browne, R., Hayashi, T., Frankel, G., 2007, TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization. *Infect. Immun.* 75, 604-612.
- Orskov, F., Orskov, I., 1992, *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. *Can. J. Microbiol.* 38, 699-704.
- Osek, J., 2001, Identification of *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoea. *Vet. Rec.* 148, 241-243.
- Oswald, E., Schmidt, H., Morabito, S., Karch, H., Marches, O., Caprioli, A., 2000, Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.* 68, 64-71.



- Otto, B.R., van Dooren, S.J., Dozois, C.M., Luirink, J., Oudega, B., 2002, *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. *Infect. Immun.* 70, 5-10.
- Peralta-Ramirez, J., Hernandez, J.M., Manning-Cela, R., Luna-Munoz, J., Garcia-Tovar, C., Nougayrede, J.P., Oswald, E., Navarro-Garcia, F., 2008, EspF Interacts with nucleation-promoting factors to recruit junctional proteins into pedestals for pedestal maturation and disruption of paracellular permeability. *Infect. Immun.* 76, 3854-3868.
- Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamousis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001, Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529-533.
- Picard, B., Garcia, J.S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahim, N., Bingen, E., Elion, J., Denamur, E., 1999, The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect. Immun.* 67, 546-553.
- Pierce, J.R., Earhart, C.F., 1986, *Escherichia coli* K-12 envelope proteins specifically required for ferrienterobactin uptake. *J. Bacteriol.* 166, 930-936.
- Pizarro-Cerda, J., Cossart, P., 2006, Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 124, 715-727.
- Provence, D.L., Curtiss, R., 3rd, 1994, Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* 62, 1369-1380.

- Ravi, M., Ngeleka, M., Kim, S.H., Gyles, C., Berthiaume, F., Mourez, M., Middleton, D., Simko, E., 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, 308-319.
- Rendon, M.A., Saldana, Z., Erdem, A.L., Monteiro-Neto, V., Vazquez, A., Kaper, J.B., Puente, J.L., Giron, J.A., 2007, Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 10637-10642.
- Riley, L.W., 2004, Distinguishing Pathovars from Non Pathovars: *Escherichia coli*, In: *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, Principles and Practices*. ASM Press, Washington, pp. 175-207.
- Riley, L.W., 2004, Laboratory Methods Used for Strains Typing of Pathogens: Conventional and Molecular Techniques, In: *Molecular Epidemiology of Infectious Diseases, Principles and Practices*. ASM Press, Washington, pp. 29-62.
- Roe, A.J., Tysall, L., Dransfield, T., Wang, D., Fraser-Pitt, D., Mahajan, A., Constandinou, C., Inglis, N., Downing, A., Talbot, R., Smith, D.G., Gally, D.L., 2007, Analysis of the expression, regulation and export of NleA-E in *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiology* 153, 1350-1360.
- Saldana, Z., Erdem, A.L., Schuller, S., Okeke, I.N., Lucas, M., Sivananthan, A., Phillips, A.D., Kaper, J.B., Puente, J.L., Giron, J.A., 2009, The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J. Bacteriol.* In press.
- Scaletsky, I.C., Pedroso, M.Z., Oliva, C.A., Carvalho, R.L., Morais, M.B., Fagundes-Neto, U., 1999, A localized adherence-like pattern as a second pattern of

- adherence of classic enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells that is associated with infantile diarrhea. *Infect. Immun.* 67, 3410-3415.
- Scaletsky, I.C., Silva, M.L., Trabulsi, L.R., 1984, Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* 45, 534-536.
- Schierack, P., Nordhoff, M., Pollmann, M., Weyrauch, K.D., Amasheh, S., Lodemann, U., Jores, J., Tachu, B., Kleta, S., Blikslager, A., Tedin, K., Wieler, L.H., 2006, Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem. Cell Biol.* 125, 293-305.
- Schubert, S., Rakin, A., Karch, H., Carniel, E., Heesemann, J., 1998, Prevalence of the "high-pathogenicity island" of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.* 66, 480-485.
- Scotland, S.M., Smith, H.R., Cheasty, T., Said, B., Willshaw, G.A., Stokes, N., Rowe, B., 1996, Use of gene probes and adhesion tests to characterise *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups isolated in the United Kingdom. *J. Med. Microbiol.* 44, 438-443.
- Shea, C.M., McIntosh, M.A., 1991, Nucleotide sequence and genetic organization of the ferric enterobactin transport system: homology to other periplasmic binding protein-dependent systems in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 5, 1415-1428.
- Sonntag, A.K., Bielaszewska, M., Mellmann, A., Dierksen, N., Schierack, P., Wieler, L.H., Schmidt, M.A., Karch, H., 2005, Shiga toxin 2e-producing *Escherichia coli* isolates from humans and pigs differ in their virulence profiles and interactions with intestinal epithelial cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 8855-8863.

- Staley, T.E., Jones, E.W., Corley, L.D., 1969, Attachment and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs. *Am. J. Pathol.* 56, 371-392.
- Stathopoulos, C., Provence, D.L., Curtiss, R., 3rd, 1999, Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect. Immun.* 67, 772-781.
- Suhr, M., Benz, I., Schmidt, M.A., 1996, Processing of the AIDA-I precursor: removal of AIDAc and evidence for the outer membrane anchoring as a beta-barrel structure. *Mol. Microbiol.* 22, 31-42.
- Taneike, I., Zhang, H.M., Wakisaka-Saito, N., Yamamoto, T., 2002, Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes. *FEBS Lett.* 524, 219-224.
- Tchesnokova, V., Aprikian, P., Yakovenko, O., Larock, C., Kidd, B., Vogel, V., Thomas, W., Sokurenko, E., 2008, Integrin-like allosteric properties of the catch bond-forming FimH adhesin of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 283, 7823-7833.
- Tobe, T., Sasakawa, C., 2001, Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. *Cell Microbiol* 3, 579-585.
- Toma, C., Higa, N., Iyoda, S., Rivas, M., Iwanaga, M., 2006, The long polar fimbriae genes identified in Shiga toxin-producing *Escherichia coli* are present in other diarrheagenic *E. coli* and in the standard *E. coli* collection of reference (ECOR) strains. *Res. Microbiol.* 157, 153-161.

- Toma, C., Martinez Espinosa, E., Song, T., Miliwebsky, E., Chinen, I., Iyoda, S., Iwanaga, M., Rivas, M., 2004, Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4937-4946.
- Tomson, F.L., Viswanathan, V.K., Kanack, K.J., Kanteti, R.P., Straub, K.V., Menet, M., Kaper, J.B., Hecht, G., 2005, Enteropathogenic *Escherichia coli* EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier. *Mol. Microbiol.* 56, 447-464.
- Torres, A.G., Giron, J.A., Perna, N.T., Burland, V., Blattner, F.R., Avelino-Flores, F., Kaper, J.B., 2002, Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.* 70, 5416-5427.
- Torres, A.G., Kanack, K.J., Tutt, C.B., Popov, V., Kaper, J.B., 2004, Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 238, 333-344.
- Trabulsi, L.R., Keller, R., Tardelli Gomes, T.A., 2002, Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg. Infect. Dis.* 8, 508-513.
- Tu, X., Nisan, I., Yona, C., Hanski, E., Rosenshine, I., 2003, EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 47, 595-606.
- Tzipori, S., Robins-Browne, R.M., Gonis, G., Hayes, J., Withers, M., McCartney, E., 1985, Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut* 26, 570-578.
- Vandekerchove, D., Vandemaele, F., Adriaensen, C., Zaleska, M., Hernalsteens, J.P., De Baets, L., Butaye, P., Van Immerseel, F., Wattiau, P., Laevens, H., Mast,

- J., Goddeeris, B., Pasmans, F., 2005, Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Vet. Microbiol.* 108, 75-87.
- Veiga, E., Cossart, P., 2006, The role of clathrin-dependent endocytosis in bacterial internalization. *Trends Cell Biol.* 16, 499-504.
- Veiga, E., Guttman, J.A., Bonazzi, M., Boucrot, E., Toledo-Arana, A., Lin, A.E., Enninga, J., Pizarro-Cerda, J., Finlay, B.B., Kirchhausen, T., Cossart, P., 2007, Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection. *Cell Host Microbe* 2, 340-351.
- Vu-Khac, H., Holoda, E., Pilipcinec, E., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Mora, A., Lopez, C., Gonzalez, E.A., Blanco, J., 2007, Serotypes, virulence genes, intimin types and PFGE profiles of *Escherichia coli* isolated from piglets with diarrhoea in Slovakia. *Vet. J.* 174, 176-187.
- Wada, Y., Nakaoka, Y., Kondo, H., Nakazawa, M., Kubo, M., 1996, Dual infection with attaching and effacing *Escherichia coli* and enterotoxigenic *Escherichia coli* in post-weaning pigs. *J. Comp. Pathol.* 114, 93-99.
- Wales, A.D., Woodward, M.J., Pearson, G.R., 2005, Attaching-effacing bacteria in animals. *J. Comp. Pathol.* 132, 1-26.
- Wickham, M.E., Lupp, C., Mascarenhas, M., Vazquez, A., Coombes, B.K., Brown, N.F., Coburn, B.A., Deng, W., Puente, J.L., Karmali, M.A., Finlay, B.B., 2006, Bacterial genetic determinants of non-O157 STEC outbreaks and hemolytic-uremic syndrome after infection. *J. Infect. Dis.* 194, 819-827.
- Wiles, T.J., Kulesus, R.R., Mulvey, M.A., 2008, Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp. Mol. Pathol.* 85, 11-19.
- Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M.S., Beaudry, M., Fairbrother, J.M., 1994, Virulence properties and attaching-effacing activity

of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect. Immun.* 62, 4153-4159.

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

Zurawski, D.V., Mumy, K.L., Badea, L., Prentice, J.A., Hartland, E.L., McCormick, B.A., Maurelli, A.T., 2008, The NleE/OspZ family of effector proteins is required for polymorphonuclear transepithelial migration, a characteristic shared by enteropathogenic *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* infections. *Infect. Immun.* 76, 369-379.

## Annexe

### **Paa, a periplasmic protein, required for attaching effacing *Escherichia coli* type III translocation**

É. Destable<sup>1</sup>, F. Berthiaume<sup>1</sup>, B. Pauchet<sup>1</sup>, J. Fairbrother<sup>1</sup>, M. Mourez<sup>1</sup>, \*J. Harel<sup>1</sup>

\*Corresponding author. Mailing address:

<sup>1</sup>Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire,  
Université de Montréal, 3200 rue Sicotte, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec,  
Canada, J2S 7C6.

Phone: [information retirée / information withdrawn]

Fax [information retirée /  
information withdrawn]

E-mail: [information retirée / information withdrawn]



### Abstract

The porcine attaching effacing associated gene (*paa*) appears to play a role in the virulence of attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) strains, since no attaching and effacing (A/E) lesions are observed with *paa* mutants in a porcine *ex vivo* model IVOC (*in vitro* Organ Culture). The *paa* gene encodes for a 27.6 kDa protein, which is identical to Paa of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 strains, EDL933 and Sakai, and was called *adfO* in these strains. In an effort to elucidate the role of Paa in the development of A/E lesions, its localization was determined as well as its influence on the secretion of proteins depending on the type III secretion system (TTSS). Paa was found to be periplasmic. In both *paa* mutants of porcine EPEC strain ECL1001 and EHEC strain EDL933 we observed a decrease in the secretion of proteins dependent on the TTSS, such as EspA, EspB and Tir. Moreover, when the plasmid pTrc99A expressing the *paa* gene was introduced into wild type and *paa* mutant strains, the secretion of some proteins including those dependent of TTSS was increased. No significant differences in expression of genes of the LEE from *paa*-positive and negative strains were observed. Paa promoted the bacterial adherence to in IPEC-J2 cultured cell monolayers and occurrence of attaching and effacing lesions. Altogether these results suggest that Paa influences the mechanism of the TTSS of AEEC strains.

**Keywords:** enteropathogenic *Escherichia coli*, enterohemorrhagic *Escherichia coli*, attaching and effacing lesions, type III secretion system, Paa.

## Introduction

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin-producing *E. coli* (STEC) are an important cause of enteric diseases in both humans and animals (Girard et al., 2005). EPEC are the most common bacterial cause of diarrhea in infants from developing countries, whereas STEC, especially those of serotype O157:H7 called enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC), are important emerging pathogens in developed countries causing food-borne infections leading to bloody diarrhea and hemolytic-uremic syndrome. EPEC, and certain STEC, cause typical, intestinal attaching and effacing (A/E) lesions and are called attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC). Attaching and effacing (A/E) lesions are characterized by intimate bacterial adherence to intestinal epithelial cells, effacement of the brush border, F-actin rearrangement, and formation of a pedestal of polymerized F-actin and other cytoskeletal elements underneath the attached bacteria (Kaper et al., 2004). AEEC share a pathogenicity island called the locus of enterocyte effacement (LEE) that is essential for tight adherence to tissue culture cells and encodes a type III secretion system (TTSS,) several effectors proteins and some regulators. Other effectors often called non-LEE effectors, have been identified outside the LEE within cryptic prophages and pathogenicity islets. The effectors are translocated directly into host cells by the TTSS. A number of regulators allow a functional translocation. Interactions between two LEE-encoded proteins, intimin (an outer membrane protein important for adherence) and Tir (the receptor translocated into host cell via the TTSS), are thought to mediate intimate adherence (Girard et al., 2005). Interactions between translocated Tir, EspF<sub>U</sub> (also known as TccP), and host proteins are thought to promote actin polymerization in host cells, resulting in pedestal formation (Ho et al., 2008).

Another non-LEE factor called porcine attaching effacing associated gene (*paa*) was identified in the porcine EPEC (PEPEC) strain ECL1001 by *TnphoA*

mutagenesis (Batisson et al., 2003; Zhu et al., 1994). Paa was shown to be required for A/E lesions formation *ex vivo* (Batisson et al., 2003; Zhu et al., 1994). The 753 bp *paa* open reading frame encodes a 27.6 kDa protein, the sequence of which is identical to AdfO of EHEC O157:H7 EDL933 and Sakai strains (An et al., 1999). The *paa/adfO* gene is located within a cryptic prophage island in O-island 57 and Sp9 respectively in EDL933 and Sakai (Leclerc et al., 2007). The aims of this study were to determine the localization of Paa in PEPEC and EHEC and, since Paa is required for the formation of A/E lesions, if it has an influence on the TTSS.

### Materials and methods

**Bacterial strains, plasmids, and media.** The *E. coli* strains and plasmids used for this study are listed in Table 1. For the detection of secreted proteins and qRT-PCR experiments, strains were grown aerobically under agitation at 37°C overnight in 5 ml of LB medium with antibiotics. These overnight cultures were diluted 1:20 in Modified Eagle Medium (MEM, GibcoBRL, Burlington, Canada) and grown again until the end of the exponential growth phase (OD<sub>600nm</sub> 1). MEM is used to enhance expression and secretion of EPEC effectors (Yoh et al., 2003). Selective antibiotics were added at the following concentrations: 100 µg/ml ampicillin, 50 µg/ml kanamycin, 100 µg/ml streptomycin, 30 µg/ml tetracycline, and 25 µg/ml chloramphenicol.

Deletion of *paa* in EDL933 was made using the lambda red recombinase-based gene replacement system (Datsenko and Wanner, 2000). Plasmid pSB315 (Galan et al., 1990) served as a template to amplify the kanamycin cassette, with kanamycin gene primers flanked by *paa*-specific sequences (Table 2). The  $\Delta paa::kan$  mutation was confirmed by PCR and sequencing. The resulting mutant was called DST04.

To construct plasmid pTrc99a::*paa* expressing Paa, the DNA sequence containing the *paa* putative ribosome binding site and the *paa*-coding region was amplified by PCR from the ECL1001 genome using primers PaaF (5'-TCA TGA GGA ACA TAA TGG

CAG GTT TTT TAA TAT TCC-3') and PaaR (5'-TCT AGA TCA AGT GCC TTT CCT GGT CC-3'), containing *BspHI* and *XbaI* sites, respectively. The resulting PCR product was digested with *BspHI* and *XbaI* (Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, Canada) and ligated into pTrc99a. pTrc99a::*paa* was transformed in *E. coli* DH5 $\alpha$ λPir, PEPEC O45 ECL1001, M155, EDL933 and DST04 strains.

### **Bacterial fractionation**

**Whole cell and culture supernatant** One ml of the culture of the strain M155c was precipitated by the addition of Trichloro-acetic acid (TCA) to a final concentration of 10 %. The other part of the culture was centrifuged at 3,700 g for 10 minutes at 4°C. The pellet was resuspended in sterile PBS and TCA was added to a 1 ml aliquot to reach a final concentration of 10%. One ml of the culture supernatant was TCA precipitated. Precipitation were conducted overnight at 4°C, followed by centrifugation at 3,700 g for 1 hour at 4°C and the pellets resuspended in 1M Tris Base.

**Periplasmic fraction** Two different techniques were used to isolate the periplasmic contents of M155c. The first technique is the cold osmotic shock, described previously (Bosse et al., 1993). Briefly, one liter of bacterial cultures were pelleted and resuspended in 125 ml of TES (0.5 M Tris; 0.5 M EDTA; 20 % sucrose; pH 8). The bacteria were then pelleted a second time, resuspended in 125 ml of 0.6 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0.1 M PMSF and pelleted again. The supernatants were filtered with a 0.2  $\mu$ m sterile filter and kept as the osmotic shock extracts. The extracts were dialyzed against distilled water three times, lyophilized and resuspended in 1 ml sterile distilled water. The other technique used is the lysosyme EDTA extraction (Betton et al., 1996). Briefly, 100 ml bacterial cultures are centrifuged for 10 minutes at 3,700 g at 4°C and the pellets resuspended in 1 ml of plasmolysis buffer (Sucrose 0.75 M, Tris-HCl 10 mM pH 7.8). A 4 mg/ml lysozyme solution in EDTA 0.1 M pH 7 is added to the plasmocytes in the proportion of 100  $\mu$ L for 800  $\mu$ L of plasmocytes

followed by an incubation on ice for 30 minutes and a centrifugation of 5 minutes at 13,000 g. The supernatants, containing the periplasmic fraction, were filtered with a 0.2 µm sterile filter and kept frozen at -20°C. As controls, beta-galactosidase activity on all fractions was tested using a standard colorimetric assay (Mourez et al., 1997) as well as the presence of GroEL was tested on fractions by Western blotting.

**Evaluation of Total *Escherichia coli* Secreted Proteins.** Fifty milliliters of MEM with the appropriate antibiotic, and 1mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) when needed, were inoculated with 2.5 ml of an LB broth overnight culture of the indicated strains, incubated at 37°C with shaking until the bacteria reached an OD<sub>600nm</sub> 1. Bacteria and cell debris were harvested by two centrifugations at 3,700 g during 20 minutes at 4°C. The secreted proteins (plus protease inhibitor cocktail, Complete Mini; Roche) were then precipitated with 10% of trichloroacetic acid (TCA) for 1 hour at 4°C. The precipitates were collected by centrifugation and washed with 95% ethanol. The resulting fractions were subjected to sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and Western blot analysis.

**Western blots.** Proteins separated by SDS-PAGE were transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were blocked in 2% nonfat milk for 30 minutes and incubated with a 1:2,000 dilution of either an anti EspA, EspB and Tir chicken polyclonal antibodies (Batisson et al., 2003; Girard et al., 2006), a 1:2,000 dilution of anti-Paa rabbit polyclonal antibody (Leclerc et al., 2007) or a 1:5,000 dilution of anti-GroEL rabbit polyclonal antibody coupled with horseradish peroxidase (Sigma, Oakville, Canada). Secondary antibodies coupled with horseradish peroxidase (goat anti-chicken immunoglobulin G (Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA) at a 1:5,000 dilution and goat anti-rabbit (Sigma, Oakville, Canada) at a 1:5,000 dilution) were used to reveal immune

complexes. Positive signals were visualized using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine solution (Sigma, Oakville, Canada).

**Transcriptional Analyses.** RNA was extracted from three biological replicate cultures of each strain grown in the same conditions as for the protein secretion assays, using the RiboPure™ bacterial RNA isolation kit (Ambion, Streetsville, Canada) following the manufacturer's guidelines. RNAs were quantified by measurement of absorbance at 260 nm. cDNAs were synthesised using SuperScript II (Invitrogen, Burlington, Canada) with random hexamers (Roche, Mississauga, Canada). QRT-PCR was performed by using the QuantiTect SybrGreen PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario) according to the manufacturer's instructions. qRT-PCR were performed on a Smart Cycler system (Cepheid, Sunnyvale, USA). For each qRT-PCR run, the calculated threshold cycle ( $C_t$ ) was normalised to the  $C_t$  of the internal control *rpsL* gene amplified from the corresponding sample, and the fold change was calculated using the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, as described (Livak and Schmittgen, 2001). The primers were designed using PrimerQuest software from Integrated DNA Technologies (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>), and are listed in Table 2.

**Qualitative adherence assay.** The adherence of ECL1001 and its derivatives to IPEC-J2 cells (porcine intestinal epithelial monolayer cells) was performed as described by Pauchet *et al.* (in preparation). Each well of a 24-well tissue plate contain  $1.7 \times 10^6$  IPEC-J2 cells in 0.5 ml DMEM-F12 (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, Burlington, Canada), 5 ng/ml of Epidermal Growth Factor (EGF, Invitrogen, Carlsbad, United States), 1% Insulin-Transferin-Selenium-X (ITS, Gibco BRL, Burlington, Canada). At this point, bacteria were previously grown for 4 hours in DMEM 1% D-mannose medium at 37°C. A multiplicity of infection of 100 bacteria for 1 cell was used. The medium was then removed from the cell monolayer and replaced with 0.5ml fresh

DMEM-F12 supplemented with 5% FBS, 5 ng/ml EGF and 1% ITS which contain bacteria. After 30 minutes of incubation, the cell monolayer was washed six times with PBS to remove the non-adherent bacteria. Fresh medium DMEM-F12 was added on each well. After 4 and 8 hours of infection, two washes with DMEM were done. Cells were fixed at 4°C overnight with 2.5% of glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate, pH 7.3). Adherent bacteria were observed under an optical microscope and photographed. To induce *paa* expression in strains harbouring pTrc99a::*paa*, IPTG (1mM) was added.

**Electron microscopy.** Infected IPEC-J2 cell monolayers were processed for electron microscopy as described previously (Girard et al., 2005). Cells were fixed overnight at 4°C in 2.5% glutaraldehyde and then rinsed in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate, pH 7.3). Samples for transmission electron microscopy (TEM) were postfixed for 1 h at room temperature in 2% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>). Tissues were then rinsed in water for 1.5 hour with regular changes and dehydrated in graded ethanol series. For TEM, tissues were embedded in Spurr resin (Marivac, St-Laurent, Quebec, Canada). Thin sections were mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined for A/E lesions with a Philips 420 transmission electron microscope at 80 kV (Philips Electronics, Eindhoven, The Netherlands).

**Statistical analysis.** Results are presented as the means ± the standard deviations of the means. A *t* test was performed with commercially available GraphPad software (Prism 4.0), and post-hoc analysis (Bonferroni's test) were done to assess differences between the groups; *P* < 0.05 was taken to be significant.

## Results

### Subcellular localization of the product encoded by the *paa* gene

In order to determine the sub-cellular localization of Paa, bacterial fractionation experiments were performed with the strain M155c. M155c is a *paa* mutant of the PEPEC strain ECL1001, M155, containing a pACYC184 plasmid bearing the *paa* gene under the control of its own promoter (Batisson et al., 2003). In this strain, Paa was more easily detectable than in wild-type ECL1001. Equivalent amounts of bacterial extracts were analysed by Western blot using anti-Paa antibodies. First, whole bacterial cell pellets were compared to culture supernatants (Fig. 1, lanes 1 and 2). The detection of a 27 kDa protein was observed mostly in the pellets, suggesting that, under those conditions, Paa is associated to the bacterial cell and not secreted.

Because Paa is predicted to be an extracytoplasmic soluble protein, its presence in the periplasm was investigated, first using the lysosyme-EDTA extraction technique. The bulk of Paa was detected in the periplasmic extract (Fig. 1, lanes 3 and 4). To confirm the presence of Paa in the periplasm, the cold osmotic shock procedure was also used as an alternative technique. This technique was also performed on PEPEC ECL1001, its *paa* mutant M155 as well as on the *paa*-positive strains EHEC O157:H7 strain EDL933 and the enterotoxinogenic *E. coli* (ETEC) O149 strain ECL8559. The *paa*-negative avirulent *E. coli* K-12 strain MG1655 was used as a negative control. Equivalent amounts of the periplasmic extracts were analysed by western blot using the anti-Paa antibodies. A 27 kDa protein is well detected in the strain ECL1001 (Fig. 2, lane 2) which is absent in the negative control (Fig. 2, lane 1) as well as in the *paa*-negative strain M155 (Fig. 2, lane 3). The same band is stronger for the complemented *paa* mutant strain M155c (Fig. 2, lane 4; Fig. 3B). This is consistent with the presence in this case of many copies of *paa* on a plasmid. The band corresponding to Paa is also well produced in the EHEC strain EDL933 (Fig. 2, lane 5) as well as in the ETEC strain ECL8559 (Fig. 2, lane 6). Moreover a western blot against GroEL and assay of the beta-galactosidase activity were performed on the



different fractions indicate that there was no cytoplasmic contamination on periplasmic fractions (Fig. 3.A and Fig.3 B). Thus, Paa, is periplasmic and expressed in diarrheagenic *E. coli* strains of different pathotypes.

Acid-glycine extraction is known to extract the surface proteins of bacteria, and a substantial amount of the PEB3 protein from *C. jejuni* that demonstrates homology with Paa was obtained by this method (Pei et al., 1991). To verify if Paa could also be at the surface of *E. coli* an acid glycine extraction was performed on the PEPEC strains. Equivalent amounts of acid-glycine extracts of ECL1001, M155 and M155c were analysed by Western blot using the polyclonal anti-Paa antibodies. No Paa could be detected in these extracts (data not shown), suggesting that Paa is not associated to the surface of *E. coli*, which is consistent with the previous results showing its periplasmic localization. This contrasts with our previous results where a few Paa molecules were localized at the bacterial surface using less purified antibodies (Batisson et al., 2003). We presume that in the latter case the antibodies recognized a surface protein unrelated to Paa. All the localisation studies were repeated and were shown to be reproducible.

### **The *paa* gene is important for the secretion of proteins by the TTSS**

Since the TTSS plays a central role in the establishment of A/E lesions and since Paa also plays a role in the development of A/E lesions, we examined the influence of Paa on the secretion of proteins of the TTSS. AEEC secrete several LEE-encoded proteins into culture media using the TTSS, including EspA, EspB, Tir, and others (reviewed in (Kaper et al., 2004).

We evaluated the secreted proteins in the culture supernatants of the PEPEC strain ECL1001, as well as its isogenic *paa* mutant and complemented mutant. Three proteins of 24, 37 and 75 kDa, corresponding the size of EspA, EspB and Tir, respectively were detected in the wild type strain by SDS-PAGE (Fig. 4, lane 2). An

important decrease in the amount of these secreted proteins is observed in the mutant strain, M155 (Fig. 4, lane 4). In the complemented mutant M155c, the presence of these proteins was restored but not at the same level of the wild-type strain (Fig. 4, lane 5). No protein was detected in the protein extract of the negative control K-12 MG1655 (Fig. 4, lane 1). Western blot analysis confirmed the identity of EspA, EspB and Tir (Fig. 6 ABC, lane 1, lane 2, lane 4, lane 5). Similar results were obtained with the EHEC strain EDL933 and its derivatives, the *paa* mutant strain DST04 and the complemented strain DST05 (Fig. 4, lane 2; Fig. 6 ABC, lane 6-10). Thus, in *paa* mutant strains the secretion of proteins depending on type III secretion system is reduced.

#### **Influence of Paa overexpression on protein secretion**

The influence of Paa overexpression on type III secretion was examined using PEPEC strain ECL1001 transformed with plasmid pTrc99a::*paa*, where *paa* gene is under control of IPTG, called strain DST02. In these conditions not only is the secretion of EspA, EspB and Tir was more important, but the presence of other proteins of sizes varying from 110 to 15 kDa was also observed (Fig. 4 lane 3; Fig. 6 ABC, lane 3). The absence of the cytoplasmic protein GroEL from the supernatants containing the secreted proteins indicated that this was not due to lysis of the cells (Fig. 5). Overexpression of *paa* also influenced the secretion pattern of the EHEC strain EDL933 transformed with plasmid pTrc99a::*paa*, strain DST03 (Fig. 4, lanes 6 and 7; Fig. 6 ABC, lanes 6 and 7). Altogether, these observations indicate that not only *paa* is important for the secretion of proteins in the supernatant but also the level of expression of *paa* modulates the quantity of secreted proteins including those of the type III secretion system.

#### **Paa does not influence the transcription or the production of type III secreted proteins of ECL1001**

To examine if Paa influenced the secretion of type III proteins by acting at the transcriptional level, a quantitative RT-PCR was performed using representative genes of each of the LEE operons and comparing the wild type strain ECL1001, the mutant M155, the complemented strain M155c and DST01. An increased expression of *paa* in ECL1001 derivative strain DST01 confirmed the induction of the pTrc::*paa* (Table 3).

To examine if Paa influenced the level of protein production (either at the translational or posttranslational levels), the presence of EspA, EspB and Tir proteins was also tested by Western blot of the whole cell bacteria of ECL1001, mutant M155, mutant M155 complemented with pTrc99a::*paa* and DST01. The amount of EspA, EspB and Tir proteins in whole bacteria was similar in all strains (data not shown).

#### **Paa influences the A/E activity of ECL1001 on IPEC-J2 cells**

The influence of Paa on the adherence and A/E activity of PEPEC strains was tested *in vitro* using IPEC-J2 intestinal cells. Compared to the wild-type strain ECL1001 and wild-type strain harboring pTrc99::*paa* DST01, the mutant strain M155 demonstrated significantly less ( $P < 0.05$ ) bacterial adherence to IPEC-J2 cells (Fig. 7). However the adherence was not restored to the wild-type level in complemented mutant DST02. The results obtained with optical microscopy (data not shown) confirmed that Paa is important for ECL1001 adherence. Further observation by TEM of infected IPEC-J2 cells indicate that the ECL1001 as well as in strains bearing the pTrc99a::*paa* DST01 and DST02. intimately adheres to IPEC-J2 cells and induce A/E lesions. Neither intimate adherence nor evidence of effacement of the adjacent brush border was noted with mutant M155 (Fig. 8).

## **Discussion**

In PEPEC, Paa was shown to participate in the formation of A/E lesions, since an isogenic *paa* mutant strain of a virulent PEPEC was unable to induce them (Dezfulian et al., 2003). The *paa* gene is present in all strains of O157:H7 EHEC and in many other types of AEEC (An et al., 1999; Leclerc et al., 2007). In the present study, we showed that Paa is periplasmic in PEPEC strain using the osmotic shock and lysozyme EDTA techniques. This result is in agreement with the bioinformatic prediction which identified Paa like an hydrophilic periplasmic protein with a Sec signal sequence. Moreover, a study from our group showed that Paa, in some ETEC O149 strains, was periplasmic (Leclerc et al., 2007). However, this is in contrast with what was previously observed with the homologs of Paa, PEB3 of *C. jejuni* and AcfC of *V. cholerae*. PEB3 is an adhesin that was suggested to be located at the bacterial surface by acid-glycine extraction (Pei et al., 1991). The *acfC* gene is part of the toxin-coregulated pilus (*tcp*) *acf* gene cluster, which has previously been shown to be required for efficient intestinal colonization and biogenesis of the toxin- coregulated pilus of *V. cholerae* (Peterson and Mekalanos, 1988). AcfC was shown to be in the culture supernatant of *V. cholerae*, but its definitive localization has not been determined yet (Everiss et al., 1994). It was previously suggested that Paa could also be at the bacterial surface because Paa-specific antibodies could reduce the adherence level of the PEPEC strains (Batisson et al., 2003). In our conditions, using two different techniques, we prove that Paa is a periplasmic protein. But it is still possible that Paa will be secreted under other growth conditions.

The function of Paa is still unknown. Using an *ex vivo* infection model, the IVOC, we have shown that in absence of Paa, AEEC do not cause A/E lesions (Batisson et al., 2003). These lesions result from the actions of proteins secreted by a type III secretion system (TTSS). We hypothesized that Paa could influence protein secretion depending on the TTSS. We observed in ECL1001 and EDL933 strains that, in the absence of Paa, the secretion levels of proteins normally secreted by the TTSS, such as the LEE-encoded EspA, EspB and Tir, decreased in mutant strains. In the complemented strain the secretion of TTSS-dependent proteins was restored at the

same level than the wild-type strain. This suggests that *paa* influences the secretion of TTSS-dependent proteins. Moreover, in wild-type PEPEC and EHEC strains, upon induction of expression *paa* under pTrc promoter, a higher level of protein secretion, including those depending on TTSS is observed. Thus, in our conditions, the secretion of various proteins is dependent on the expression level of *paa*.

How could Paa influence the expression levels of the LEE-encoded TTSS proteins? Paa could indirectly control a transcriptional regulator. Regulation of the LEE genes is intricate and multifactorial. The LEE region contains *ler*, a regulatory gene, which encodes a protein that directly activates transcription of the LEE genes by counteracting H-NS repression (Haack et al., 2003). In addition, several other regulators have been implicated in the control of LEE genes at the transcriptional level, including Per (Gomez-Duarte and Kaper, 1995; Russell et al., 2007), GadX (Shin et al., 2001), H-NS (Bustamante et al., 2001; Haack et al., 2003), *hha* (Sharma and Zuerner, 2004), *pch* (Iyoda and Watanabe, 2004), IHF (Yona-Nadler et al., 2003), EtrA and EivF (Zhang et al., 2004). However, our transcriptional results did not reveal any significant difference in the expression of the LEE genes between the wild-type and the mutant strains. Paa did not seem to act at the transcriptional level of genes encoding proteins depending on TTSS nor did it appear to influence the production levels of EspA, EspB and Tir.

We hypothesize that Paa acts at the periplasmic level on the functionality of TTSS. Another study in EHEC O157:H7 strain EDL933, showed a similar effect of Paa on the type II secretion system (Ho et al., 2008). The *paa* homolog *adfO* (Z2053 gene) was found as a single transcriptional unit in a phage-related genomic islet called O57 in EHEC O157:H7 strain EDL933. An *adfO/paa* homolog mutant exhibited marked reduction in adherence to HeLa cells and in the secretion of several proteins into the supernatant. YodA, one of these secreted proteins, was found to be a substrate for the

EHEC pO157 encoded type 2 secretion system (T2SS). Paa seems to perform at the periplasmic level on the functionality of the type II secretion system (Ho et al., 2008).

Collectively, the results point towards the importance of Paa not only in the adherence to porcine intestinal cell but also in the formation of A/E lesions. Previously, we have showed that Paa influenced the development of A/E lesion in porcine intestinal *in vitro* organ culture system using porcine and rabbit enteropathogenic *E. coli* strains (Batisson et al., 2003). It is tempting to argue that the mechanism of action of Paa is via its modulation of secretion of proteins most importantly those that are TTSS-dependent. Two known proteins encoded by the LEE, SepL and SepD, influence the secretion of proteins depending on TTSS. A *sepL* mutation exhibits enhanced secretion of effectors and reduced secretion of translocators. SepL, a soluble cytoplasmic protein interacts with SepD, a component of TTSS, to form a membrane bound complex. SepL and SepD are suggested to form a molecular switch controlling translocators and effectors secretion. *sepL* mutation induces a diminution of the secretion of LEE proteins but on many other potential effectors (Tobe et al., 2006). It would be interesting to identify if Paa interacts in conjunction with other partners involved in A/E mechanisms. As Paa and its homolog AdfO affects the protein secretion in the supernatant and bacterial adherence (Batisson et al., 2003; Ho et al., 2008), the understanding of the role of Paa in the AE mechanism needs further development.

### Acknowledgements

We are grateful to Sébastien Leclerc for his preliminary work on Paa localization in EPEC. We thank Nikhil Thomas Dalhousie at the University for his advice

concerning the secretion of proteins. We thank Martin Lamarche (University of Montréal) and Christine Martin (INRA Theix Clermont Ferrand, France) for their technical advices concerning the construction of pTrc99a::*paa* and, EDL933 *paa* mutant, respectively This work was supported in part by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) (STP 307430) and by the Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) (121927) and, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) (11946).

## References

- An, H., Fairbrother, J.M., Desautels, C., Harel, J., 1999, Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 473, 179-184.
- Batisson, I., Guimond, M.P., Girard, F., An, H., Zhu, C., Oswald, E., Fairbrother, J.M., Jacques, M., Harel, J., 2003, Characterization of the novel factor *paa* involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* 71, 4516-4525.
- Betton, J.M., Boscus, D., Missiakas, D., Raina, S., Hofnung, M., 1996, Probing the structural role of an alpha beta loop of maltose-binding protein by mutagenesis: heat-shock induction by loop variants of the maltose-binding protein that form periplasmic inclusion bodies. *J Mol Biol* 262, 140-150.
- Bosse, M., Handl, C.E., Lortie, L.A., Harel, J., Dubreuil, J.D., 1993, Fusion of the genes encoding *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b (STb) and the maltose-binding protein to obtain mature STb enterotoxin. *J Gen Microbiol* 139, 631-638.
- Bustamante, V.H., Santana, F.J., Calva, E., Puente, J.L., 2001, Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Mol Microbiol* 39, 664-678.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L., 2000, One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 6640-6645.
- Dezfulian, H., Batisson, I., Fairbrother, J.M., Lau, P.C., Nassar, A., Szatmari, G., Harel, J., 2003, Presence and characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* virulence genes in F165-positive *E. coli* strains isolated from diseased calves and pigs. *J Clin Microbiol* 41, 1375-1385.



- Dezfulian, H., Tremblay, D., Harel, J., 2004, Molecular characterization of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) pathogenicity islands in F165-positive *E. coli* strain from a diseased animal. FEMS Microbiol Lett 238, 321-332.
- Everiss, K.D., Hughes, K.J., Kovach, M.E., Peterson, K.M., 1994, The *Vibrio cholerae acfB* colonization determinant encodes an inner membrane protein that is related to a family of signal-transducing proteins. Infect Immun 62, 3289-3298.
- Galan, J.E., Nakayama, K., Curtiss, R., 3rd, 1990, Cloning and characterization of the *asd* gene of *Salmonella typhimurium*: use in stable maintenance of recombinant plasmids in *Salmonella* vaccine strains. Gene 94, 29-35.
- Girard, F., Batisson, I., Frankel, G.M., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2005, Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. Infect Immun 73, 6005-6016.
- Girard, F., Batisson, I., Martinez, G., Breton, C., Harel, J., Fairbrother, J.M., 2006, Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. FEMS Immunol Med Microbiol 46, 340-350.
- Gomez-Duarte, O.G., Kaper, J.B., 1995, A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 63, 1767-1776.
- Haack, K.R., Robinson, C.L., Miller, K.J., Fowlkes, J.W., Mellies, J.L., 2003, Interaction of Ler at the LEE5 (*tir*) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun 71, 384-392.

- Hélie, P., Morin, M., Jacques, M., Fairbrother, J.M., 1991, Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infect Immun* 59, 814-821.
- Ho, T.D., Davis, B.M., Ritchie, J.M., Waldor, M.K., 2008, Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic *Escherichia coli* adherence and intestinal colonization. *Infect Immun* 76, 1858-1865.
- Iyoda, S., Watanabe, H., 2004, Positive effects of multiple *pch* genes on expression of the locus of enterocyte effacement genes and adherence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 to HEp-2 cells. *Microbiology* 150, 2357-2571.
- Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004, Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2, 123-140.
- Leclerc, S., Boerlin, P., Gyles, C., Dubreuil, J.D., Mourez, M., Fairbrother, J.M., Harel, J., 2007, *paa*, originally identified in attaching and effacing *Escherichia coli*, is also associated with enterotoxigenic *E. coli*. *Res Microbiol* 158, 97-104.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25, 402-408.
- Mourez, M., Skouloubris, S., Betton, J.M., Dassa, E., 1997, Heat shock induction by a misassembled cytoplasmic membrane protein complex in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 26, 821-831.
- Pei, Z.H., Ellison, R.T., 3rd, Blaser, M.J., 1991, Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem* 266, 16363-16369.

- Perna, N.T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J.D., Rose, D.J., Mayhew, G.F., Evans, P.S., Gregor, J., Kirkpatrick, H.A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E.J., Davis, N.W., Lim, A., Dimalanta, E.T., Potamouisis, K.D., Apodaca, J., Anantharaman, T.S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D.C., Welch, R.A., Blattner, F.R., 2001, Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* 409, 529-533.
- Peterson, K.M., Mekalanos, J.J., 1988, Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect Immun* 56, 2822-2829.
- Russell, R.M., Sharp, F.C., Rasko, D.A., Sperandio, V., 2007, QseA and GrlR/GrlA regulation of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 189, 5387-5392.
- Sharma, V.K., Zuerner, R.L., 2004, Role of *hha* and *ler* in transcriptional regulation of the *esp* operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 186, 7290-7301.
- Shin, S., Castanie-Cornet, M.P., Foster, J.W., Crawford, J.A., Brinkley, C., Kaper, J.B., 2001, An activator of glutamate decarboxylase genes regulates the expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes through control of the plasmid-encoded regulator, Per. *Mol Microbiol* 41, 1133-1150.
- Tobe, T., Beatson, S.A., Taniguchi, H., Abe, H., Bailey, C.M., Fivian, A., Younis, R., Matthews, S., Marches, O., Frankel, G., Hayashi, T., Pallen, M.J., 2006, An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14941-14946.

- Yoh, M., Bi, Z., Matsuyama, J., Nagayama, K., Honda, T., 2003, Effect of environmental conditions on proteins secreted by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O26:H11. *Microbiol Immunol* 47, 1-6.
- Yona-Nadler, C., Umanski, T., Aizawa, S., Friedberg, D., Rosenshine, I., 2003, Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology* 149, 877-884.
- Zhang, L., Chaudhuri, R.R., Constantinidou, C., Hobman, J.L., Patel, M.D., Jones, A.C., Sarti, D., Roe, A.J., Vlisidou, I., Shaw, R.K., Falciani, F., Stevens, M.P., Gally, D.L., Knutton, S., Frankel, G., Penn, C.W., Pallen, M.J., 2004, Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Infect Immun* 72, 7282-7293.
- Zhu, C., Harel, J., Jacques, M., Desautels, C., Donnenberg, M.S., Beaudry, M., Fairbrother, J.M., 1994, Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* 62, 4153-4159.

## Legends

**FIGURE 1. Localisation of Paa in the porcine EPEC strain. ECL1001 complemented mutant strain M115c (Paa +)** were fractionated into cytoplasm (P) and periplasm (Per) fractions using lysosyme-EDTA extraction method described under Materials and Methods. Fractions of whole cells (WC) and supernatant (S) were also analyzed. Western blot  $\alpha$ -Paa of the bacterial fractionation of the strain M115c. Western blot samples were resolved on SDS-12% polyacrylamide gels.

FIGURE 2. Localisation of Paa in different AEEC strains. Western blot  $\alpha$ -Paa of the periplasmic fractions of different *E. coli* strains. **Lane 1, MG1655 K-12 (Paa -); Lane 2, PEPEC strain ECL1001 (Paa +); Lane 3, paa mutant strain M155 (Paa -); Lane 4, complemented mutant strain M155c (Paa +); Lane 5, EHEC strain EDL933 (Paa +); Lane 6, ETEC strain ECL8559 (Paa +).**

**FIGURE 3. Subcellular localization of Paa. ECL1001 complemented mutant strain M115c (Paa +)** were fractionated into cytoplasm (P) and periplasm (Per) fractions using the ice-cold osmotic shock method described under Materials and Methods. Fractions of whole cells (WC) and supernatant (S) were kept for control. (A) Quantification of  $\beta$ -lactamase absorbance, using the 4 fractions of ice-cold osmotic shock of M115c ; (B) Western blot analysis of cultures of M115c (Paa +) and K-12 (Paa -). Western blot samples were resolved on SDS-12% polyacrylamide gels. GroEL was used as a fractionation marker by probing with anti-GroEL serum. K-12 was used as a marker of absence of Paa.

**FIGURE 4. Paa is important for efficient protein secretion.** Coomassie blue stained SDS-PAGE of secreted proteins of ECL1001 and EDL933 and its derivatives. Lane 1, MG1655 K-12; Lane 2, ECL1001 (Paa +); Lane 3, ECL1001 overexpressing *paa* DST01 DST01 (Paa ++); Lane 4, ECL1001 *paa* mutant M155 (Paa -); Lane 5,

complemented ECL1001 *paa* mutant DST02; Lane 6, MG1655 K-12; Lane 7, EDL933 (Paa +); Lane 8, EDL933 overexpressing *paa* DST03 (Paa ++); Lane 9, EDL933 *paa* mutant DST04 (Paa -); Lane 10, complemented EDL933 *paa* mutant DST05 (Paa ++).

**FIGURE 5. Western blot for GroEL.** Fractions of whole cells (WC) and supernatant (S) were tested using anti-GroEL. Lane 1, MG1655 K-12; Lane 2, ECL1001; Lane 3, ECL1001 overexpressing *paa* DST01.

**FIGURE 6. Paa is important for efficient type III protein secretion. Western blot for TTSS-dependant secreted proteins of ECL1001 and EDL933 and its derivatives.**(A): Anti-EspA on secreted proteins ; (B): Anti-EspB on secreted proteins ; (C): Anti-Tir on secreted proteins. Lane 1, MG1655 K-12 (Paa -); Lane 2, ECL1001 (Paa +); Lane 3, ECL1001 overexpressing *paa* DST01 (Paa ++); Lane 4, ECL1001 *paa* mutant M155 (Paa -); Lane 5, complemented ECL1001 *paa* mutant DST02 (Paa ++); Lane 6, MG1655 K-12 (Paa -); Lane 7, EDL933 (Paa +); Lane 8, EDL933 overexpressing *paa* DST03 (Paa ++); Lane 9, EDL933 *paa* mutant DST04 (Paa -); Lane 10, complemented EDL933 *paa* mutant DST05 (Paa ++).

**FIGURE 7. Paa influences the adherence of PEPEC to porcine intestinal cells IPEC-J2 cells.** Adhesion assays. After 4 h, the cells were washed with PBS and adhering bacteria were recovered, plated, and counted. The data are the colony forming unit. All the data were compared to the wild type strain ECL1001. Significant differences ( $P < 0.05$ ) are indicated by asterisks.

**FIGURE 8. Paa influences PEPEC bacterial intimate adherence and attaching and effacing capacity to porcine intestinal cells IPEC-J2.** TEM micrographs showed attachment of bacteria with effacement of the brush border beneath the bacterial adherence site after inoculation of IPEC-J2 cells with PEPEC strain ECL1001 (A; magnification, x45,000), wild-type strain overexpressing *paa* DST01

(B; magnification, x45,000), the complemented mutant strain DST02 (D; magnification, x45,000). Intact brush borders at the surface of epithelial cells inoculated with the *TnphoA* mutant M155 (C; magnification, x45,000) were observed.

## Tables and figures

TABLE 1. List of strains and plasmid used for this study

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Bacterial strain		
MG1655	<i>E. coli</i> K-12	(Dezfulian et al., 2004)
ECL1001	PEPEC O45 <i>paa</i> <sup>+</sup>	The <i>E. coli</i> Laboratory (Hélie et al., 1991)
DST01	ECL1001 pTrc99a:: <i>paa</i>	This study
M155	ECL1001 <i>paa</i> :: <i>TnphoA</i>	(Batisson et al., 2003)
DST02	M155 pTrc99a:: <i>paa</i>	This study
M155c	M155 pACYC184:: <i>paa</i>	(Batisson et al., 2003)
EDL933	EHEC O157:H7 <i>paa</i> <sup>+</sup>	(Perna et al., 2001)
DST03	EHEC O157:H7 pTrc99a:: <i>paa</i>	This study
DST04	EDL933Δ <i>paa</i> :: <i>km</i>	This study
DST05	EDL933Δ <i>paa</i> :: <i>km</i> pTrc99a:: <i>paa</i>	This study
ECL8559	ETEC O149 <i>paa</i> <sup>+</sup>	The <i>E. coli</i> Laboratory (Hélie et al., 1991)
Plasmid		
pTrc99a	Double strand-DNA 4176 BP	Pharmacia Biotech
pKD46	Double strand-DNA 4176 BP 6329 bp; Red recombinase plasmid pKD46	(Datsenko and Wanner, 2000)
pSB315	Source of terminatorless Km cassette; Km <sup>r</sup>	(Galan et al., 1990)

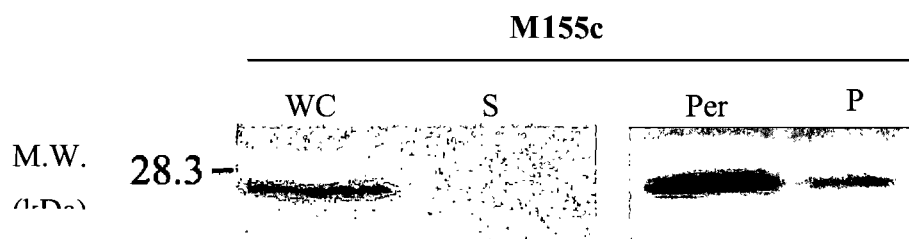


TABLE 2. Oligonucleotides used for this study.

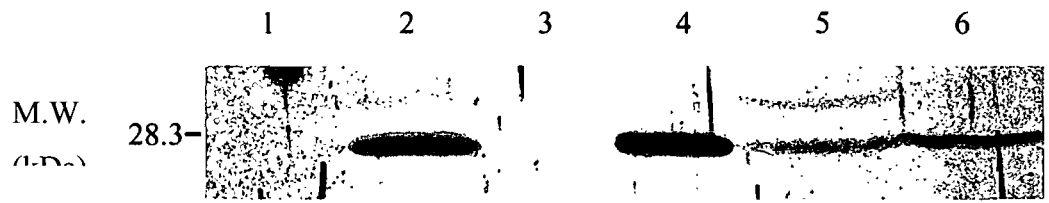
Gene	Sequence (5'-3')	Amplicon size (bp)
<i>paakmfor</i>	ATG AGG AAC ATA ATG GCA GGT TTT TTA ATA TTC CTG TCT TCT GCT GCT TAT CCG GAT CCG TCG ACC TGC AGG	
<i>paakmrev</i>	TCA AGT GCC TTT CCT GGT CCA GCC ATA TTT TTT GAA TGC AGG CGC CGC TTC CCC	1 200
<i>espAF</i>	TTC AGT GCG CTT CTC ATG TTT GCC	101
<i>espAR</i>	TTG GGC TGT GGT TGA CTC CTT AGA	
<i>espBF</i>	CAC GAA GAC ATT GCC AAC AAC GGT	143
<i>espBR</i>	ATA TCA TCC TGC GCT CTG CGA ACT	
<i>tirF</i>	TGC ACC GCC ATT ACC TTC ACA AAC	221
<i>tirR</i>	TGA AGA ACT TCA AGC GCA CCA TGC	
<i>lerF</i>	TAC AAC AGG AAG CAA AGC GAC TGC	230
<i>lerR</i>	ACA GTG CTT CTT TAA GCC AGC GTG	
<i>escCF</i>	AAC CAA AGC AAT GCT CAG GAT GCC	170
<i>escCR</i>	AAC AGG AAT GTC GCT TAA CAG CGG	
<i>escVfor-RT</i>	CCG CCA ACA ACA AAG TTA CCG AAG	114
<i>escVrev-RT</i>	TGT TGA TTA CGA CGT TGA TGC GCC	
<i>paaF</i>	TAG AAA CTG TCG CCG CAA TC	240
<i>paaR</i>	CAT TCT GCA AAT CGA CGG G	
<i>rpsL-R</i>	TTC CTA CAT CGG TGG TGA AGG TCA	176
<i>rpsL-F</i>	TTA GGA CGC TTC ACG CCA TAC TTG	

**TABLE 3. Relative expression of LEE for ECL1001 and its derivatives, paa mutant M155 and complemented mutant M155c as measured by quantitative real-time RT-PCR. Strains were grown to OD<sub>600nm</sub> 1.0 in MEM. Primers used for each gene are indicated in Table 2. Ct values were normalized to levels of *rpsL* mRNA to correct for variations in bacterial numbers.**

<b>Genes</b>	<b>ECL1001 vs M155</b>	<b>M155 vs M155c</b>
	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
<i>espA</i>	0,84	1,99
<i>espB</i>	0,76	0,77
<i>tir</i>	2,04	1,58
<i>ler</i>	0,5	0,74
<i>escC</i>	0,93	1,58
<i>escV</i>	0,36	0,59



**Figure 1.**



**Figure 2.**

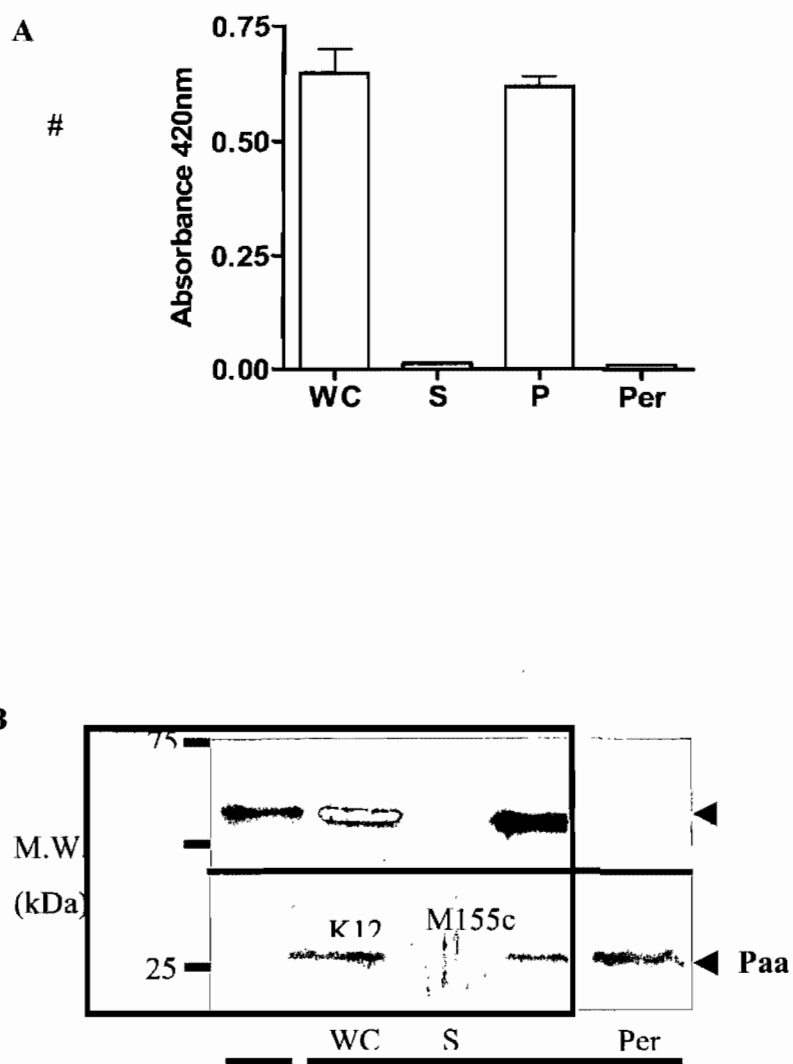
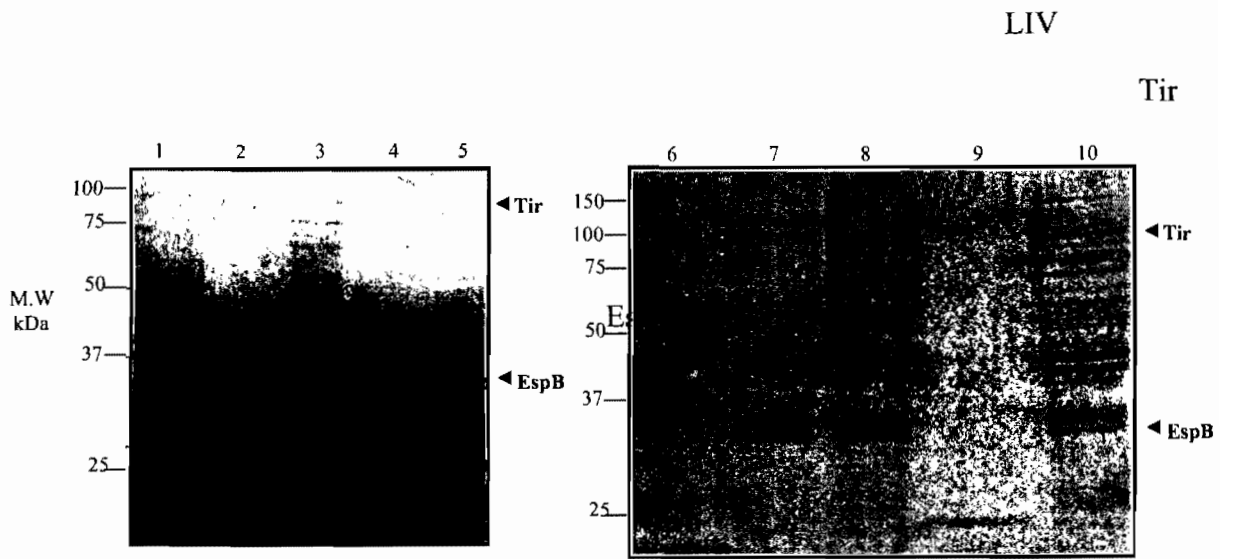


Figure 3.



**Figure 4.**

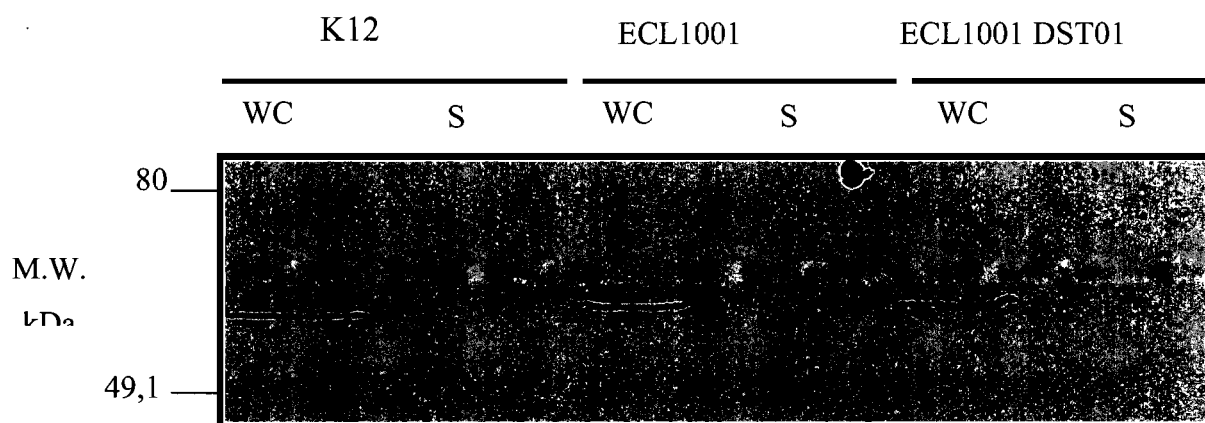
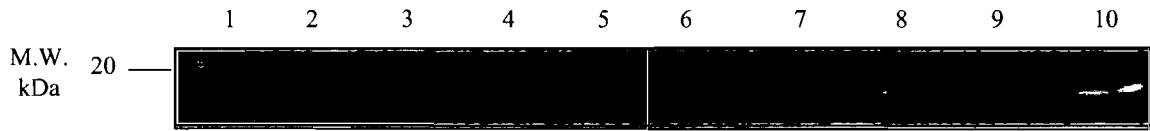
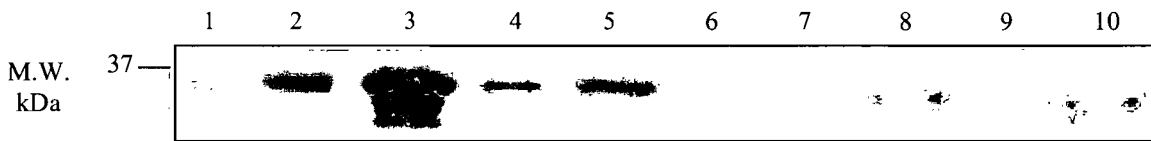


Figure 5.



**Figure 6A.**



**Figure 6B.**



**Figure 6C.**



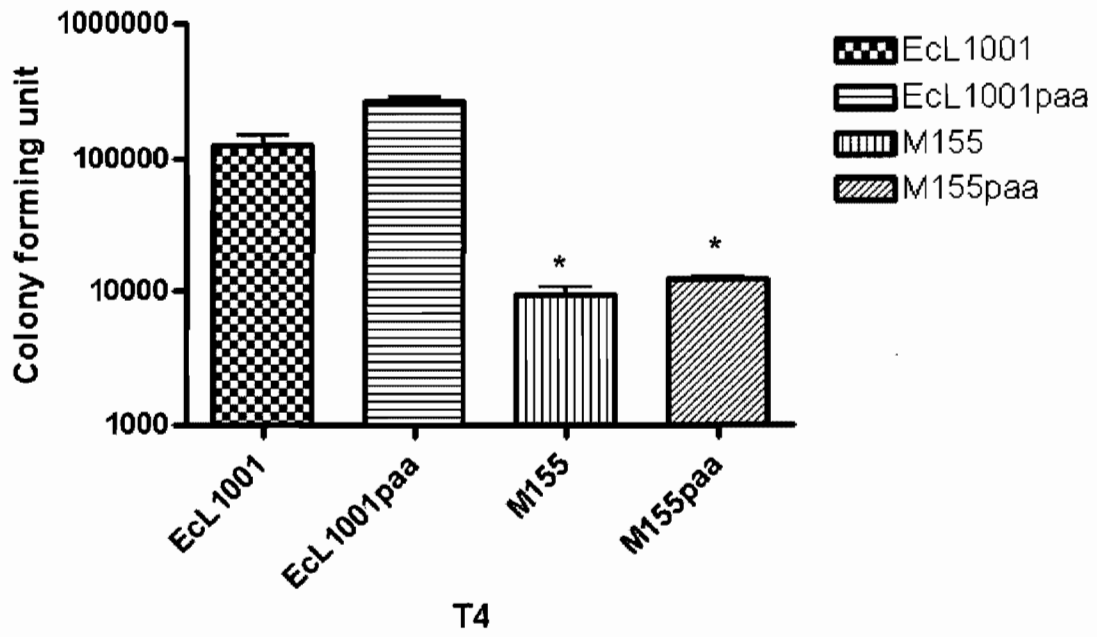


Figure 7.

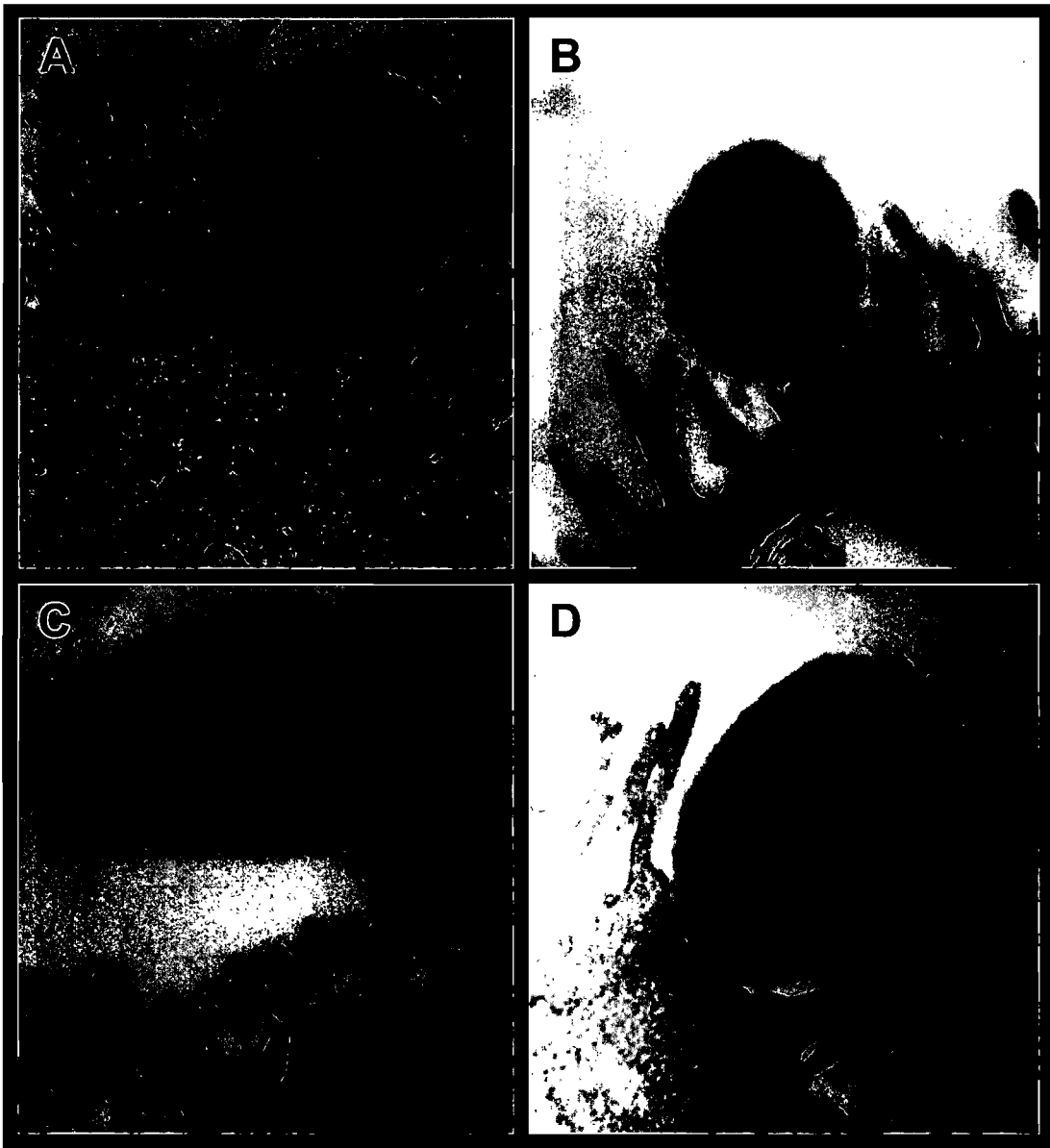


Figure 8.