

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

Rôle de Paa dans la pathogénicité des *Escherichia coli* attachants et effaçants (AEEC)

par

Élodie Destable

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

Mai 2008

© Élodie Destable, 2008



Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

Rôle de Paa dans la pathogénicité des *Escherichia coli* attachants et effaçants (AEEC)

présenté par

Élodie Destable

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Marie Archambault, présidente-rapporteuse

Josée Harel, directrice de recherche

Michaël Mourez, codirecteur

Patrick Boerlin, membre du jury

Résumé

Le gène *paa* (porcine attaching effacing associated) intervient dans la pathogénicité des *Escherichia coli* attachants et effaçants (AEEC), puisque moins de lésions attachantes et effaçantes (A/E) sont observées chez la souche mutante *paa* dans un modèle IVOC (*in vitro* Organ Culture). La protéine Paa, de 27,6 kDa, trouvée initialement chez une souche *E. coli* entéropathogène (EPEC) de porc est identique à celle retrouvée chez les souches *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) O157:H7 (EDL933 et Sakai). La localisation bactérienne et l'implication de Paa dans la cascade d'évènements menant au phénomène de lésions A/E ne sont pas connues. Les prédictions bio-informatiques indiquent que Paa serait une protéine périplasmique. Un fractionnement cellulaire réalisé par choc osmotique permet de confirmer la localisation périplasmique de Paa chez une souche d'origine porcine EPEC ECL1001. Étant donné que la formation des lésions A/E est dépendante de la mise en place du système de sécrétion de type III (SSTT) et de l'injection des effecteurs, nous avons émis l'hypothèse que Paa influence l'action de protéines secrétées par le SSTT. Paa pourrait exercer son influence en affectant la sécrétion et/ou la production des protéines dépendantes du SSTT ou en altérant l'assemblage de l'appareil de sécrétion. L'analyse du surnageant de culture des souches sauvages EPEC ECL1001 et EHEC EDL933, et des souches dérivées soit les souches mutantes *paa* M155 et DST04 et celle complémentée DST02 et DST05, indique que Paa favorise la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT. Une diminution de la sécrétion d'EspA, EspB et Tir (protéines dépendantes du SSTT) a été observée chez les souches mutantes *paa* M155 et DST04 comparativement à ECL1001 et EDL933. Aucune différence significative n'est observée entre la souche sauvage ECL1001 et celle *paa* mutante M155 dans l'analyse de la production des protéines dépendantes du SSTT et de la transcription de leurs gènes. La surexpression de Paa à l'aide du plasmide pTrc99a, dans les souches sauvages EPEC ECL1001 et EHEC O157:H7 EDL933, montre une augmentation de la sécrétion des protéines, entre autre, celles dépendantes du SSTT. L'effet de Paa sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT est donc proportionnel à son niveau d'expression. Paa participe à l'adhérence bactérienne aux cellules porcines IPEC-J2 et favorise la formation des lésions attachantes et effaçantes. Ces résultats suggèrent que Paa influence le mécanisme de sécrétion du SSTT chez les souches AEEC.

Mots clés: *Escherichia coli* entéropathogène, *Escherichia coli* entérohémorragique, lésions attachantes et effaçantes, système de sécrétion de type III, Paa

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.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|--|-----------|
| Résumé..... | iii |
| Abstract..... | v |
| Table des matières..... | vii |
| Liste des tableaux..... | xi |
| Liste des figures..... | xii |
| Liste des sigles et abréviations..... | xv |
| Remerciements..... | xviii |
| | |
| INTRODUCTION..... | 1 |
| | |
| RECENSION DE LA LITTÉRATURE | 5 |
| | |
| 1 LES <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATHOGÈNES..... | 6 |
| 1.1 Généralités | 6 |
| 1.2 Les <i>Escherichia coli</i> à tropisme intestinal..... | 7 |
| 1.2.1 Les différents pathotypes | 7 |
| 1.2.2 Les EHEC | 9 |
| 1.2.3 Les EPEC | 10 |
| | |
| 2 LES PATHOGÈNES CAUSANT LES LÉSIONS ATTACHANTES ET EFFAÇANTES (A/E)..... | 11 |
| 2.1 Les <i>Escherichia coli</i> attachant et effaçant (AEEC)..... | 11 |
| 2.1.1 Les lésions attachantes et effaçantes (A/E)..... | 11 |
| 2.1.2 Déroulement de l'infection en 3 étapes..... | 12 |
| 2.1.2.1 Première étape: attachement initial non intime..... | 12 |
| 2.1.2.2 Seconde étape: mise en place du SSTT et attachement intime..... | 13 |
| 2.1.2.3 Troisième étape: réarrangement du cytosquelette, effacement des microvillosités et formation du piédestal | 14 |
| 2.1.3 Le processus menant à la diarrhée | 17 |
| 2.2 <i>Citrobacter rodentium</i>..... | 18 |
| 2.3 <i>Hafnia alvei</i> | 19 |
| | |
| 3 LES DÉTERMINANTS GÉNÉTIQUES IMPLIQUÉS DANS LA VIRULENCE DES AEEC..... | 19 |
| 3.1 Le LEE..... | 19 |
| 3.1.1 Généralités..... | 19 |
| 3.1.2 Les déterminants présents sur LEE..... | 21 |
| 3.1.2.1 L'adhésine intimine..... | 26 |

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 3.1.2.2 | Le système de sécrétion de type III..... | 27 |
| 3.1.2.2.1 | Le corps basal..... | 29 |
| 3.1.2.2.2 | L'aiguille: le filament EspA..... | 30 |
| 3.1.2.2.3 | Les translocateurs: EspB (EaeB) et EspD..... | 31 |
| 3.1.2.3 | Les effecteurs du SSTT..... | 32 |
| 3.1.2.3.1 | Les effecteurs responsables de la modulation du cytosquelette de l'hôte | 32 |
| 3.1.2.3.1.1 | Tir (EspE, Hp90)..... | 32 |
| 3.1.2.3.1.2 | EspG et EspG2..... | 34 |
| 3.1.2.3.1.3 | EspH (Orf18)..... | 35 |
| 3.1.2.3.2 | Les effecteurs agissant au niveau mitochondrial et au niveau de la | |
| | perméabilité de la barrière intestinale..... | 36 |
| 3.1.2.3.2.1 | Map..... | 36 |
| 3.1.2.3.2.2 | EspF..... | 37 |
| 3.1.2.3.3 | Effecteur à fonction inconnue SepZ (EspZ)..... | 38 |
| 3.1.2.4 | Les chaperonnes cytoplasmiques..... | 39 |
| 3.2 | Les autres déterminants non présents sur le LEE..... | 41 |
| 3.2.1 | Facteurs de virulence indépendants du SSTT..... | 44 |
| 3.2.1.1 | BFP..... | 44 |
| 3.2.1.2 | StcE..... | 45 |
| 3.2.1.3 | Les autotransporteurs..... | 46 |
| 3.2.1.3.1 | EspC..... | 46 |
| 3.2.1.3.2 | EspP..... | 46 |
| 3.2.1.3.3 | EhaA..... | 47 |
| 3.2.1.4 | LifA/EafI et ToxB..... | 47 |
| 3.2.2 | Les facteurs de virulence dépendants du SSTT..... | 48 |
| 3.2.2.1 | Cif..... | 48 |
| 3.2.2.2 | Les autres Esp..... | 49 |
| 3.2.2.2.1 | EspJ..... | 49 |
| 3.2.2.2.2 | EspFu ou Tccp (Tir cytoskeleton coupling protein)..... | 49 |
| 3.2.2.2.3 | EspK..... | 51 |
| 3.2.2.2.4 | EspM..... | 51 |
| 3.2.2.3 | La famille des effecteurs non-LEE (Nle)..... | 51 |
| 3.2.2.3.1 | NleA (EspI)..... | 51 |
| 3.2.2.3.2 | NleC et NleD..... | 52 |
| 3.2.2.3.3 | NleH1 et NleH2..... | 53 |
| 3.2.2.3.4 | NleB..... | 53 |
| 3.2.2.3.5 | NleF..... | 53 |
| 3.2.2.3.6 | NleE..... | 54 |
| 3.2.2.3.7 | NleI/NleG..... | 54 |
| 4 | LES SYSTÈMES DE RÉGULATION CONNUS À CE JOUR CHEZ LES | |
| | PATHOGENES ATTACHANTS ET EFFACANTS..... | 55 |
| 4.1 | Les régulateurs spécifiques..... | 59 |
| 4.1.1 | Ler..... | 59 |
| 4.1.2 | Le locus <i>perABC/pchABC</i> | 60 |
| 4.1.3 | GrlA (global regulator of LEE activator) et GrlR (repressor)..... | 60 |

| | | |
|------------|--|-----------|
| 4.1.4 | SepL et SepD | 61 |
| 4.2 | Les régulateurs globaux..... | 61 |
| 4.2.1 | H-NS | 62 |
| 4.2.2 | Le système GAD..... | 62 |
| 4.2.3 | Régulation par les conditions de culture | 63 |
| 4.2.4 | Quorum sensing (QS)..... | 64 |
| 5 | PAA: UNE NOUVELLE PROTÉINE RÉGULATRICE POTENTIELLE..... | 65 |
| 5.1 | Découverte | 65 |
| 5.2 | Caractéristiques..... | 66 |
| 5.2.1 | AcfC | 67 |
| 5.2.2 | PEB3 | 67 |
| 5.3 | Projet Paa..... | 68 |
| 5.3.1 | Souches utilisées | 68 |
| 5.3.1.1 | EPEC porcine (PEPEC) ECL1001 (anciennement 86-1390) | 68 |
| 5.3.1.2 | La souche REPEC E22 (Rabbit EPEC) | 69 |
| 5.3.1.3 | La souche humaine EHEC O157:H7 EDL933..... | 70 |
| 5.3.2 | Description du projet..... | 71 |
| | MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS..... | 72 |
| | ARTICLE..... | 73 |
| | Paa, a periplasmic protein, required for attaching effacing <i>Escherichia coli</i> type III translocation..... | 74 |
| | Abstract..... | 75 |
| | Introduction..... | 76 |
| | Materials and methods..... | 78 |
| | Bacterial strains, plasmids, and media..... | 78 |
| | Bacterial fractionation..... | 78 |
| | Evaluation of Total <i>Escherichia coli</i> Secreted Proteins..... | 79 |
| | Western blots Nitrocellulose..... | 79 |
| | Transcriptional Analyses..... | 80 |
| | Qualitative adherence assây..... | 80 |
| | Electron microscopy..... | 81 |
| | Statistical analysis..... | 81 |
| | Results..... | 82 |
| | Subcellular localization of the product encoded by the <i>paa</i> gene..... | 82 |
| | The <i>paa</i> gene is important for the secretion of proteins..... | 83 |
| | Influence of Paa overexpression on secretion of proteins..... | 83 |
| | Paa does not influence the transcription and the production of type III secreted proteins..... | 84 |
| | Paa influences the A/E activity of ECL1001 on IPEC-J2 cells..... | 84 |
| | Discussion..... | 86 |

| | |
|--|--------|
| Acknowledgements | 89 |
| References | 90 |
| Legends | 93 |
| Tables and figures | 95 |
| DISCUSSION | 106 |
| Discussion | 107 |
| Localisation cellulaire de Paa chez la souche PEPEC ECL1001..... | 107 |
| Influence de Paa sur la sécrétion des protéines..... | 108 |
| Influence de Paa sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT chez la souche d'origine porcine ECL1001 et d'origine humaine EDL933 et sur l'adhérence bactérienne et la formation de lésions attachantes et effaçantes | 108 |
| Influence de Paa sur la sécrétion d'autres protéines chez la souche d'origine porcine ECL1001 et humaine EDL933..... | 112 |
| Effets de Paa chez la souche lapine E22..... | 112 |
| Conclusion | 114 |
| Perspectives | 115 |
| Rôle de Paa dans la pathogénicité des EPEC..... | 115 |
| Détermination de la régulation de Paa..... | 115 |
| Rôle de Paa dans la pathogénicité des EHEC..... | 115 |
| Rôle de Paa dans la pathogénicité des ETEC..... | 116 |
| BIBLIOGRAPHIE | 117 |
| ANNEXES | xix |
| Annexe 1 | xx |
| Annexe 2 | xxi |
| Annexe 3 | xxii |
| Annexe 4 | xxiii |
| Annexe 5 | xxiv |
| Annexe 6 | xxv |
| Annexe 7 | xxvii |
| Annexe 8 | xxviii |
| Annexe 9 | xxix |
| Annexe 10 | xxx |

LISTE DES TABLEAUX

Introduction

| | |
|--|----|
| Tableau I. Comparaison entre le LEE de la souche EPEC ECL1001 et le LEE de la souche EHEC O157:H7 EDL933..... | 22 |
| Tableau II. Facteurs de virulence présents en dehors du LEE et intervenant dans la pathogénicité des EPEC et/ou des EHEC..... | 42 |
| Tableau III. Facteurs de régulation présents chez les EPEC et/ou les EHEC..... | 56 |

Méthodologie et résultats

Article

| | |
|---|----|
| TABLE 1. List of strains and plasmid used for this study..... | 95 |
| TABLE 2. Oligonucleotides used for real time RT-PCR..... | 96 |
| TABLE 3. Relative expression of LEE for ECL1001 and its derivatives, M155 and for M155c..... | 97 |

Discussion

| | |
|---|-----|
| Tableau I. Effecteurs présents sur l'îlot Sp9 chez EHEC O157:H7 Sakai..... | 109 |
|---|-----|

Annexes

Annexe 1:

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

LISTE DES FIGURES

Introduction

| | |
|--|----|
| Figure 1: Observation en microscopie électronique des lésions A/E causées par une souche EPEC aux cellules épithéliales d'origine lapine..... | 11 |
| Figure 2: Les différents types d'adhérence des EPEC aux cellules HeLa..... | 12 |
| Figure 3: Formation du piédestal observé en microscopie électronique chez une souche EPEC aux cellules HeLa | 14 |
| Figure 4: Trois différentes voies utilisées par les AEEC pour réorganiser l'actine | 15 |
| Figure 5: Organisation structurale de la cortactine et les sites de liaison de ses différents partenaires..... | 16 |
| Figure 6: Organisation génétique du LEE portant les gènes codants pour les facteurs de virulence chez les AEEC | 21 |
| Figure 7: Liaison de l'intimine avec son récepteur Tir | 26 |
| Figure 8: Structure du système de sécrétion de type III chez les EPEC/EHEC..... | 28 |
| Figure 9: Mode d'action d'EspG et EspG2 dans la cytoplasme de la cellule hôte..... | 35 |
| Figure 10: Mode d'action de Map..... | 37 |
| Figure 11: Mode d'action de la chaperonne CesT..... | 40 |
| Figure 12: Observation en microscopie électronique du pili BFP présent à la surface des EPEC | 44 |
| Figure 13: Mode d'action d'EspFu..... | 50 |
| Figure 14: Mode de régulation du LEE chez les EPEC (A) et chez les EHEC (B)..... | 58 |
| Figure 15: Organisation génétique des O islands dans le génome de la souche EHEC O157:H7 EDL933..... | 70 |

Méthodologie et résultats

Article

| | |
|---|----|
| Figure 1. Localisation of Paa in the porcine EPEC strain | 98 |
| Figure 2. Localisation of Paa in different AEEC strains | 99 |

| | |
|---|-----|
| Figure 3. Subcellular localization of Paa..... | 100 |
| Figure 4. The presence of Paa is important for efficient type III effector secretion..... | 101 |
| Figure 5. Western blot for GroEL..... | 102 |
| Figure 6. Western blot for TTSS-dependant secreted proteins of all strains..... | 103 |
| Figure 7. Paa influences the adherence of PEPEC to porcine intestinal cells IPEC-J2 cells..... | 104 |
| Figure 8. Paa influences PEPEC bacterial intimate adherence and attaching and effacing capacity to porcine intestinal cells IPEC-J2..... | 105 |

Annexes

Annexe 2:

| | |
|--|-----|
| Figure 1. The presence of Paa is important for efficient type III effector secretion Coomasie blue stained of the SDS-PAGE of secreted proteins..... | xxi |
|--|-----|

Annexe 3:

| | |
|--|------|
| Figure 2. Western blot anti-EspB on secreted proteins for TTSS-dependant secreted proteins of E22 strain and derivatives..... | xxii |
|--|------|

Annexe 4:

| | |
|--|-------|
| Figure 3. The presence of Paa is important for efficient type III effector secretion Coomasie blue stained of the SDS-PAGE of secreted proteins..... | xxiii |
|--|-------|

Annexe 5:

| | |
|---|------|
| Figure 4. Western blot anti-EspB on secreted proteins for TTSS-dependant secreted proteins of all strains..... | xxiv |
|---|------|

Annexe 6

| | |
|---|-----|
| Figure 5. Transcriptional profiles of LEE expression for E22, E22 Δ pa a and for E22 Δ pa a FGC..... | xxv |
|---|-----|

Annexe 7

| | |
|--|-------|
| Figure 6. Paa is not important for efficient type III protein production at OD _{600nm} =1.0..... | xxvii |
|--|-------|

Annexe 8

| | |
|--|--------|
| Figure 7. Western blot for MalE | xxviii |
|--|--------|

Annexe 9

Figure 8. Paa is not important for efficient type III protein production at the end of stationary phase..... xxix

Annexe 10

Figure 9. Paa is important for protein secretion in DH5 α Pir..... xxx

LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS

| | |
|------------|---|
| Å | Angström |
| A/E | Attachant et effaçant: <i>Attaching and effacing</i> |
| Acf | Facteur de colonisation accessoire: <i>Accessory colonization factor</i> |
| AD | Adhérence diffuse |
| AEEC | <i>E. coli</i> attachant et effaçant: <i>Attaching and effacing E. coli</i> |
| AIDA | Adhésine impliquée dans l'adhérence diffuse |
| AL | Adhérence localisée |
| Arp2/3 | Complexe de protéines reliées à l'actine |
| BFP | Bundle forming pilus |
| C1-INH | Inhibiteur d'estérase 1 |
| CBD | CesT binding domain |
| Ces | Chaperone of <i>E. coli</i> secreted |
| CFA | Colonization factor antigen |
| CP | Cryptic prophage |
| DAEC | <i>E. coli</i> à adhérence diffuse: <i>Diffusely adhering E. coli</i> |
| DMEM | Dubelcco's modified eagle's medium |
| <i>eae</i> | <i>E. coli</i> attaching and effacing |
| EAEC | <i>E. coli</i> entéroaggrégatif |
| EAF | Facteur adhésif des EPEC: <i>EPEC adhesif factor</i> |
| EBP50 | ERM binding phosphoprotein |
| EHEC | <i>E. coli</i> entérohémorragique: <i>Enterohemorrhagic E. coli</i> |
| EIEC | <i>E. coli</i> entéroinvasif |
| EPEC | <i>E. coli</i> entéropathogène: <i>Enteropathogenic E. coli</i> |

| | |
|--------|--|
| ERM | Ezrin-radixin-moesin |
| Esc | <i>E. coli</i> secretion |
| Esp | Protéines sécrétées des EPEC: <i>EPEC secreted protein</i> |
| ETEC | <i>E. coli</i> entérotoxigène: Enterotoxigenic <i>E. coli</i> |
| GBD | GTPase binding domain |
| H-NS | Protéine de type histone structure du nucléoïde |
| Il | Interleukine |
| IVOC | <i>In vitro</i> organ culture |
| LB | Milieu Luria-Bertani: <i>Lysogeny-Broth media</i> |
| LEE | Locus d'effacement des entérocytes: <i>Locus of effacement enterocytes</i> |
| Ler | LEE-encoded regulator |
| LPF | Long Polar Fimbriae |
| LRR | Leucine Repeat Region |
| Map | Mitochondrial associated protein |
| MEM | Minimum Essential Medium |
| MLC | Myosin Light Chain: chaîne légère de myosine |
| NPY | Séquence asparagine-proline-tyrosine |
| N-WASP | Wiskott-Aldrich Syndrom Protein |
| OI# | O-island numéro |
| ORF | Cadre de lecture ouvert : <i>Open reading frame</i> |
| Paa | Porcine attaching effacing associated protein |
| PAGE | Électrophorèse de gel d'acrylamide: <i>Polyacrylamid gel electrophoresis</i> |
| Pch | PerC homologue |
| PDZ | PSD-95/Dsk-large/ZO-1 |

| | |
|-----------|---|
| PEPEC | Porcine EPEC |
| Per | Plasmid-encoded regulator |
| PRR | Prolin Repeat Region |
| QS | Quorum Sensing |
| rpm | Révolution par minute |
| Sbp | Sulfate binding protein |
| SDS | Sodium Dodecyl Sulfate |
| Sec | Secretory |
| selC | Sélénocystéine |
| SH2 | Src Homology 2 |
| SH3 | Src Homology 3 |
| SHU | Syndrome Hémolytique Urémique |
| SNX9 | Sorting Nexin 9 |
| SSTT | Système de sécrétion de type III: <i>Type three secretion system (TTSS)</i> |
| TCA | Acide trichloroacétique: <i>Trichloroacetic acid</i> |
| TER | Transepithelium resistance |
| Tir | Translocated intimin receptor |
| Tn $phoA$ | Transposon <i>phoA</i> |
| TRL | Thréonine Arginine Leucine |
| WxxxE | Motif retrouvé dans des effecteurs du SSTT |

REMERCIEMENTS

Cette maîtrise m'a permis d'acquérir beaucoup d'expériences professionnelles et personnelles, où j'ai appris, entre autres, à travailler en équipe et à développer mon esprit critique. Tout ceci a été possible grâce à l'intervention de nombreuses personnes que je tiens à remercier:

- Ma directrice, Dre Josée Harel pour m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche. Un grand merci pour son soutien inconditionnel, sa compréhension, son savoir, sa motivation pour la recherche et sa qualité de formation me permettant entre autre de participer à des congrès.

- Mon co-directeur, Dr Michaël Mourez pour sa passion démesurée pour la recherche, ses connaissances inépuisables, ses conseils judicieux, sa spontanéité et sa disponibilité.

- Les membres de mon comité conseil pour leurs idées: Dr Jacques Lussier, Dr John Fairbrother et Dr Daniel Dubreuil.

- Merci aux membres du laboratoire pour l'ambiance très conviviale et familiale qui a régnée au cours de ma maîtrise. Ce fut très agréable et enrichissant de travailler en votre compagnie

- Merci aussi à Josée Labrie, Marie Astrid Albert, Victoria Girard, Christine Taillon, Frédérick Berthiaume et Andrée Déry pour leur soutien, leur aide et leurs conseils.

- Enfin, merci à ma famille, mes amis d'ici et de France pour vos encouragements indénombrables.

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* attachants et effaçants (AEEC) sont responsables de désordres intestinaux chez les humains [3] et chez diverses espèces animales dont le lapin [4] et le porc [5-7]. Ce groupe se compose des *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et de certains *E. coli* entérohémorragiques (EHEC A/E+), principalement ceux de sérotype O157:H7 [8, 9]. Les EHEC sont responsables de toxi-infections alimentaires graves (syndrome hémolytique et urémique ou SHU). En septembre 2006 aux États-Unis, une toxi-infection alimentaire, causée par l'ingestion d'épinards contaminés par EHEC O157:H7, a été reportée. Ceci eu un impact sur l'économie pour les soins médicaux (50 cas de maladie, un décès et huit cas de syndrome hémolytique et urémique) et pour la perte de productivité.

La pathogénicité des AEEC s'observe par le développement de lésions intestinales appelées lésions d'attachement et d'effacement (A/E), caractérisées par l'adhérence intime de la bactérie à la cellule épithéliale intestinale, l'effacement de la bordure en brosse, le réarrangement du cytosquelette de la cellule infectée et la formation d'une structure en pseudopode appelée piédestal. Le développement des lésions A/E dépend de la mise en place par les AEEC du système de sécrétion de type III (SSTT) et de l'injection par ce dernier d'effecteurs bactériens directement dans le cytosol de la cellule hôte. Les protéines effectrices ainsi injectées interagissent avec des molécules de la cellule hôte, exploitant ainsi les voies de signalisation cellulaire de l'hôte afin de coloniser la muqueuse intestinale et de résister à ses mécanismes innés de défense.

Le SSTT ainsi que certains de ces effecteurs sont codés par un îlot de pathogénicité appelé locus d'effacement des entérocytes (locus of enterocytes effacement, LEE) [10]. Depuis quelques années, cependant, de nouveaux effecteurs ont été identifiés mais ils sont localisés sur d'autres îlots que le LEE. L'expression de tous ces facteurs de virulence localisés sur différents îlots est orchestrée par de nombreux régulateurs qui agissent de façon coordonnée.

Un nouveau facteur de virulence, Paa (porcine attaching-effacing associated), a été identifié chez la souche d'origine porcine EPEC (PEPEC) ECL1001 de sérotype O45:H- [11]. L'implication de Paa dans les lésions A/E a été démontrée dans le modèle d'infection IVOC (*in vitro* Organ Culture) de porcelet [2]. La mutation créée par l'insertion du transposon *TnphoA* dans le gène *paa* de la souche PEPEC ECL1001, de même que la

délétion chromosomique du gène *paa* de la souche lapine EPEC (REPEC) E22, ont significativement diminué l'adhérence de ces souches. Leur complémentation en trans du gène *paa* a restauré leur capacité à causer des lésions A/E [2]. Le gène *paa* est présent chez des souches AEEC, dont les EPEC et les EHEC d'origines animale et humaine mais aussi chez des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) d'origine animale. Il est remarquable que 100 % des isolats EHEC O157:H7 possèdent *paa*. De plus, des porcelets infectés par des isolats PEPEC Paa-négatifs ne présentaient pas de diarrhée ou développaient des symptômes retardés de diarrhée. Ces résultats suggèrent que Paa est important pour le développement de lésions A/E. Une adhésion initiale de la bactérie avec la cellule hôte ainsi que la mise en place du SSTT et l'injection des effecteurs va entraîner la formation des lésions A/E. En absence de Paa ces lésions ne se forment pas. Il semblerait que Paa soit impliqué dans des étapes précoces de la pathogénicité des PEPEC, c'est-à-dire dans l'adhésion initiale et/ou la mise en place du SSTT. Le cadre de lecture ouvert de *paa* de 753 pb code pour une protéine d'environ 27,6 kDa (251 acides aminés), et est presque identique à celui des souches STEC O157:H7 EDL933 et Sakai, et des souches ETEC entérotoxigènes. Paa partage également une certaine homologie avec des protéines de virulence telles que PEB3 (51,8%) de *Campylobacter jejuni* et AcfC (49%) de *Vibrio cholerae* [2, 12]. Le gène *paa* des EHEC se retrouve dans un îlot de pathogénicité (OI#57/Sp9, EDL933 et Sakai respectivement). Chez EHEC O157:H7 Sakai, l'îlot Sp9 porte des séquences de phage lambdaïde ainsi que des gènes codants pour des effecteurs du SSTT, récemment découverts. Les caractéristiques de Paa, et le fait qu'il ne semble pas être restreint qu'à un pathotype chez les *E. coli*, suggèrent que Paa a un rôle important dans la virulence de différents pathotypes.

L'implication de Paa dans la cascade d'évènements menant au phénomène de lésions A/E n'est pas connue. Étant donné que la formation des lésions A/E est dépendante de la mise en place du SSTT et de l'injection des effecteurs, nous émettons l'hypothèse que Paa influence l'action de protéines secrétées par le SSTT. Paa pourrait exercer son influence en affectant la sécrétion et/ou la production des protéines dépendantes du SSTT ou en altérant l'assemblage de l'appareil de sécrétion. L'objectif de cette étude est de mieux cerner le rôle de Paa dans le développement des lésions A/E. Nous avons d'abord caractérisé la localisation cellulaire de Paa, puis déterminé son influence sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT. Nous avons testé l'implication de Paa chez les souches

EHEC et les souches EPEC porcines. Ces deux pathotypes possédant tous deux Paa causent des lésions A/E mais les mécanismes d'induction de ces lésions, quoique similaires, diffèrent entre eux.

RECENSION DE LA LITTÉRATURE

1 Les *Escherichia coli* pathogènes

1.1 Généralités

C'est en 1885 que Theodore Escherich, un pédiatre allemand, identifie pour la première fois la bactérie *Escherichia coli* [3]. Cette bactérie, dont la disposition des flagelles est péritriche, est un bacille à gram négatif non-sporulant, mobile et anaérobie facultatif de la famille des entérobactéries.

E. coli appartient à la microflore commensale intestinale de l'homme et d'autres espèces animales. Il existe cependant une trentaine de sérotypes responsables d'infections. Le système de typage sérologique ou sérotypie est basé sur les propriétés antigéniques du lipopolysaccharide (O) et du flagelle (H). La combinaison des antigènes O et H définit ainsi la structure antigénique des différents sérotypes d'*E. coli*. Cependant le sérotypage n'est pas toujours en rapport avec la pathogénicité. De plus, les souches pathogènes possèdent des propriétés spécifiques permettant de les regrouper dans des pathotypes. Chaque pathotype est associé à un mécanisme d'infection propre et à un syndrome infectieux caractéristique [3].

E. coli est peut-être l'organisme vivant le plus étudié à ce jour: sa découverte précoce et sa culture aisée (division cellulaire toutes les 20 minutes à 37°C dans un milieu riche) en font un outil d'étude pratique. En industrie agro-alimentaire, *E. coli* est particulièrement contrôlé. En effet, il est un bon indicateur de contamination d'un aliment lors de son processus de fabrication [13].

Ces dernières années, grâce aux progrès du séquençage, plusieurs génomes d'*E. coli* ont été entièrement séquencés comme la souche commensale *E. coli* K-12 MG1655 [14] et les souches pathogènes *E. coli* entérohémorragique (EHEC) O157:H7 EDL933 [15] et EHEC O157:H7 Sakai [16].

Certaines souches d'*E. coli* sont associées à des pathologies très diverses (y compris extra-intestinales) chez l'homme et chez l'animal: diarrhées, gastro-entérites, infections du tractus urinaire, méningites, septicémies, syndrome hémolytique et urémique (SHU). On peut classer ces bactéries pathogènes en deux groupes suivant leur lieu d'infection: celles à tropisme intestinal et celles à tropisme extra-intestinal. Dans le cadre de ce mémoire, seuls les *E. coli* à tropisme intestinal seront envisagés.

1.2 Les *Escherichia coli* à tropisme intestinal

Chez l'humain, l'intestin est composé de l'intestin grêle ou petit intestin (comprenant le duodénum, le jéjunum et l'iléon) et du gros intestin (comprenant le cæcum, le côlon et le rectum). Cet environnement abrite près de 500 espèces de micro-organismes différents représentant plus de 10^{14} bactéries, c'est-à-dire dix fois plus que le nombre de cellules humaines dans le corps. La flore intestinale se développe au cours des premiers jours de la vie et demeure ensuite, sauf en cas de maladie, étonnamment stable [17].

Une fonction importante de la flore intestinale est la digestion des substances du bolus alimentaire que l'organisme humain ne peut prendre en charge lui-même. Une autre fonction importante est la synthèse de substances essentielles, comme la vitamine K qui joue un rôle dans la coagulation sanguine.

Hormis les souches de la flore commensale, on peut également retrouver dans l'intestin des souches pathogènes responsables de diarrhées. Agissant au niveau des entérocytes de l'épithélium intestinal, elles ont acquis la capacité d'adhérer, de coloniser et d'envahir la muqueuse à ce niveau et de produire des toxines et d'autres facteurs de virulence. Ces souches sont groupées en six classes, ou six "pathotypes" selon les signes cliniques engendrés et les facteurs de virulence exprimés. Cette classification est détaillée dans les paragraphes suivants.

1.2.1 Les différents pathotypes

- **Les EIEC:** les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) sont à l'origine de syndromes dysentériques avec diarrhée fébrile muco-sanglante. Ils provoquent des ulcérations de la muqueuse du gros intestin, d'où la présence de pus et parfois de sang dans les selles. Elles envahissent l'épithélium du colon via les cellules M, lysent les vacuoles endocytaires, se multiplient de manière intracellulaire et se répandent de cellule à cellule jusqu'à la lamina propria. Tous les gènes requis pour l'invasion sont situés sur un plasmide de 140 MDa, portant le locus *ipa* (invasine plasmide antigène). Ce locus code pour une série de protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III (SST) Mxi-Spa [18].

- **Les EAEC:** les souches *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC) colonisent le petit et le gros intestin. Elles se caractérisent par un type d'adhésion agrégative (AA) en "briques empilées" à l'origine de nécrose au pôle apical des villosités avec œdème inflammatoire et

hémorragique de la sous-muqueuse [19]. Découvert en 1987, ce pathotype est associé plus particulièrement à des diarrhées aqueuses persistantes pouvant durer plus de 14 jours chez les jeunes enfants des pays en développement (Inde, Brésil, Mexico, Chili) ou des pays développés, mais aussi à des diarrhées sanglantes occasionnelles. Ce sont les adhésines AAF (Aggregative Adherence Fimbriae) I et II, codées par un plasmide de virulence appelé pAA, qui est à l'origine de ce type d'adhésion. Ces bactéries produisent aussi une toxine sensible à la chaleur (toxine labile: LT) et une toxine stable à la chaleur (EAST1) [20], [21]. Les EAEC se retrouvent également chez les bovins, les cochons et les chevaux [22].

- **Les DAEC:** les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC), qui sont considérées comme des organismes non-invasifs, ont été récemment associés à des diarrhées aiguës et persistantes chez les enfants dans les pays développés ou en développement. Les diarrhées peuvent être aqueuses et contenir du mucus. La durée moyenne est de 8 jours. Les DAEC adhèrent aux cellules Hep-2 (lignée immortelle) et à une variété de lignées cellulaires de mammifères de manière diffuse par l'intermédiaire d'adhésines spécifiques comme l'autotransporteur AIDA-I [23] ou le fimbriae F1845 [24].

- **Les ETEC:** les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont une cause majeure de diarrhée infantile dans les pays en développement et de diarrhée chez les voyageurs. L'incidence de ces infections est estimée à 650 millions de cas par année avec 800 000 morts, majoritairement des enfants âgés de moins de cinq ans dans les pays en développement [25]. Les ETEC sont également responsables de diarrhée chez les bovins et les porcs entraînant de nombreuses pertes économiques dans l'industrie bovine et porcine [26]. Les ETEC adhèrent aux cellules de la muqueuse intestinale par des-pili (Colonization Factor Antigen CFA) et des adhésines comme TibA et Tia (Toxigenic invasion loci A et B) [27]. Elle produit ensuite des toxines thermo-stables (STa, STb) et thermolabiles (LT), qui déclenche la diarrhée. En effet, la toxine LT, par exemple, active l'adénylcyclase cellulaire entraînant l'accumulation d'AMP cyclique (AMPc) intracellulaire et une fuite hydroélectrolytique, diminuant l'absorption du sodium, du chlore, de l'eau, menant ainsi à la diarrhée. Les ETEC possèdent d'autres facteurs de virulence comme la sérine protéase EatA qui dégrade le protéoglycan de la cellule hôte par son activité mucinase et la toxine ClyA, qui forme des pores dans la membrane menant ainsi à la mort cellulaire [25].

1.2.2 Les EHEC

Aux États-Unis, les EHEC ont été à l'origine en 1982 de deux épidémies de colite hémorragique sévère, nécessitant une hospitalisation de 70% des malades. C'est le sérotype O157:H7 qui en fut la cause. De 1982 jusqu'à 2002, d'autres cas d'infections humaines (diarrhées sanguines et SHU) consécutives à la consommation d'aliments contaminés par les EHEC y ont été rapportés. Le sérotype O157:H7 est responsable de plus de 73 000 cas d'infections dont 250 décès par année. Les dernières épidémies (205 cas, dont 3 décès), étaient dues à l'ingestion d'épinards frais en sacs [28]. Ainsi le sérotype O157:H7, dont la dose infectieuse est très faible (de l'ordre d'1 à 100 bactéries) représente un danger pour la santé publique, avec un impact important pour les industries agroalimentaires. La production de la toxine Stx est essentielle mais pas suffisante pour la virulence des EHEC. Les souches EHEC forment des lésions au niveau du colon et de l'iléum. Certaines sont capables de causer des lésions attachantes et effaçantes (A/E) caractérisées par la destruction localisée des microvillosités de la bordure en brosse, et d'induire des altérations au niveau du cytosquelette des cellules épithéliales. La diarrhée pourrait être due, entre autres, à l'effacement de la bordure en brosse entraînant des troubles d'absorption des électrolytes. Les facteurs de virulence responsables de ces lésions sont présents sur un îlot de pathogénicité appelé le locus d'effacement des entérocytes (LEE) localisé sur le chromosome bactérien. Cet îlot (54 cadres de lecture ouverts) code pour un système de sécrétion de type III (SSTT) et certains de ses effecteurs. Les souches EHEC qui ne possèdent pas le LEE sont internalisées par les cellules épithéliales (bactéries intracellulaires localisées dans des vacuoles) par rapport aux EHEC LEE+ qui demeurent extracellulaires à la surface de l'épithélium [29].

Les EHEC possèdent un large plasmide de virulence appelé pO157 de 92 kb. Ce plasmide est retrouvé chez des souches EHEC O157 mais aussi fréquemment chez les souches non-O157.

Les souches EHEC possèdent également l'opéron *lpf* apparenté au long fimbriae polaire de *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* et qui permet l'adhésion aux cellules hôtes [30].

Les EHEC ne causent que très rarement des maladies chez les animaux et les ruminants, qui sont en général le réservoir naturel de ces bactéries [30].

1.2.3 Les EPEC

Les études réalisées par Bray et *al.* en Écosse dans les années 1940 ont permis d'établir que certains sérotypes d'*E. coli* peuvent causer des gastro-entérites infantiles associées à d'importants problèmes de déshydratation. Ces sérotypes sont connus comme les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), premier pathotype d'*E. coli* découvert et associé à une maladie humaine. Les EPEC sont à l'origine d'entérites épidémiques, notamment au Royaume-Uni dans les années 1960, en Europe et aux États-Unis. Toutefois, leur incidence a fortement diminué dans les pays développés mais reste importante dans les pays en développement avec des taux de mortalité variant entre 10% et 40% [31].

L'humain est considéré comme l'hôte primaire des souches EPEC, qui n'expriment pas la toxine Stx, mais qui causent des maladies aussi bien chez l'homme que chez les animaux en tapissant les muqueuse du petit et du gros intestin [32] [33]. L'infection s'accompagne d'importants problèmes de déshydratation, de fièvre, de malaise et de vomissements. Contrairement aux EHEC, la dose infectieuse chez l'homme est beaucoup plus élevée (10^8 - 10^{10} bactéries) [34].

Les EPEC colonisent la muqueuse intestinale en adhérant fortement aux entérocytes intestinaux par des adhésines non-fibrillaires. Elles produisent ensuite des lésions A/E caractérisées comme chez les EHEC par la destruction localisée des microvillosités de la bordure en brosse, et induisent des altérations au niveau du cytosquelette des cellules épithéliales (formation du piédestal). La diarrhée pourrait être due, entre autre, à l'effacement de la bordure en brosse qui entraîne des troubles d'absorption des électrolytes. De plus, les EPEC sont capables de persister chez l'hôte en formant des biofilms.

Les EPEC, comme les EHEC, possèdent le locus de pathogénicité appelé LEE, qui contient 41 cadres de lecture ouverts (soit 13 gènes de moins que le LEE des EHEC), correspondant à la majeure partie des facteurs de virulence [35]. Certaines EPEC contiennent, en plus du LEE, le plasmide EAF (EPEC Adherence Factor) et sont dites "EPEC typiques". Le plasmide EAF contient les gènes *bfp* codant les protéines BFP (Bundle Forming Pilus, un fimbriae de type IV) nécessaires à l'adhérence localisée (AL). Contrairement aux souches EPEC typiques, les EPEC atypiques adhèrent généralement de façon diffuse (AD) [36].

2 Les pathogènes causant les lésions attachantes et effaçantes (A/E)

2.1 Les *Escherichia coli* attachant et effaçant (AEEC)

Les *E. coli* responsables de lésions intestinales dites A/E (AEEC) constituent un groupe d'*E. coli* pathogènes commun à l'homme et aux animaux. Ils incluent les EHEC qui possèdent le LEE, et les EPEC. La prise de conscience du danger des AEEC, en particulier des EHEC, fait suite à leur implication récente dans des cas de SHU mortels après consommation d'aliments contaminés, en particulier d'origine bovine [37]. Depuis, ce type de lésions et les mécanismes qui les provoquent font l'objet de recherches approfondies.

2.1.1 Les lésions attachantes et effaçantes (A/E)

Les premières lésions A/E ont été décrites en 1969 chez des porcelets nouveaux-nés infectés par une souche EPEC humaine de sérotype O55:H7 [38]. Cependant, le terme A/E n'a été utilisé pour la première fois qu'en 1983 sur base d'observations en microscopie électronique montrant les bactéries adhérents de façon intime et entraînant un effacement des microvillosités des cellules épithéliales intestinales (Figure 1), d'où le terme de lésions A/E [39]. Ce type de lésions fut aussi observé en 1986 chez les souches EHEC O157:H7 [40].

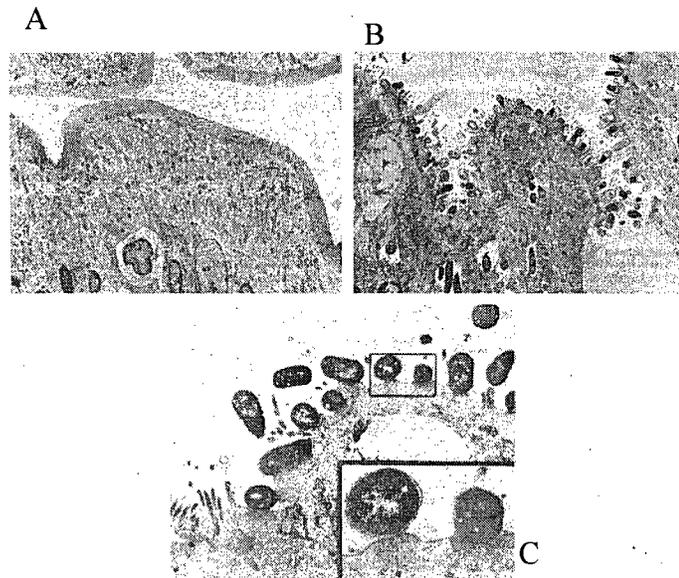


Figure 1: Observation en microscopie électronique des lésions A/E causées par une souche EPEC aux cellules épithéliales d'origine lapine. A: épithélium intestinal non infecté avec microvillosités intactes; B et C: épithélium intestinal infecté avec EPEC avec effacement des microvillosités [39].

Suite aux mises en évidence des caractéristiques histopathologiques des infections causées par les AEEC, les études se sont poursuivies pour tenter de mieux comprendre le mécanisme de pathogénicité. De multiples découvertes ont permis de caractériser la chronologie de l'infection en 3 étapes [41].

2.1.2 Dérroulement de l'infection en 3 étapes

2.1.2.1 Première étape: attachement initial non intime

La bactérie pathogène adhère tout d'abord de façon non intime aux cellules épithéliales de l'intestin grâce à différents facteurs de virulence dont les adhésines, les flagelles et les pili de type IV [42]. Cette première étape est essentielle à la pathogénicité de la bactérie car, sans cet attachement, elle ne peut mettre en place le SSTT, essentiel à l'injection des facteurs de virulence. L'attachement initial est donc une cible potentielle pour des vaccins.

Le type d'adhésine employé pour cet attachement initial non intime varie en fonction de la souche *E. coli* (EPEC, EHEC). La variation de l'hôte, du tropisme tissulaire et de la virulence peuvent être associés à l'expression de ces différentes adhésines.

Pour les souches EPEC, il existe deux types d'adhérence: l'adhérence localisée (AL; Figure 2A) et l'adhérence diffuse (AD; Figure 2B) [43]. Les EPEC dites "typiques" adhèrent de façon localisée (un ou plusieurs sites à la surface de la cellule épithéliale intestinale) sous forme de microcolonies aux cellules épithéliales Hep-2 [44]. Ce type d'adhérence est dû à la présence du plasmide EAF qui code la protéine BFP [45]. Les EPEC dites "atypiques", par contre, adhèrent généralement de manière diffuse et se retrouvent donc réparties de façon uniforme sur la surface de la cellule épithéliale intestinale.

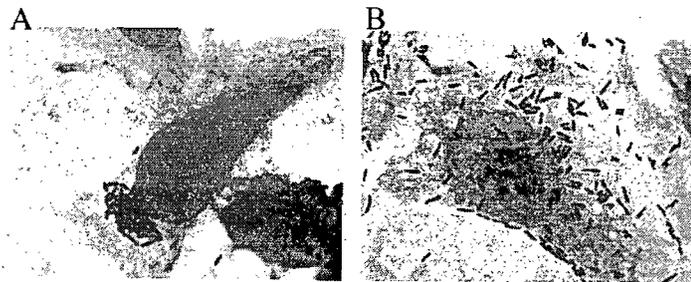


Figure 2: Les différents types d'adhérence des EPEC aux cellules HeLa. A: EPEC typiques: adhérence localisée (AL); B: EPEC atypiques: adhérence diffuse (AD) [43].

Chez les EPEC, d'autres facteurs peuvent aider à l'adhérence diffuse: le fimbriae de type I, qui permet la reconnaissance des glycoprotéines α -D-mannose, la protéine OmpA, qui permet l'adhérence aux cellules HeLa, le facteur Efa (*E. coli* factor for adherence) ou LifA permettant la colonisation intestinale, et enfin la flagelline FliC qui peut servir aussi à l'adhérence [46].

Pour les souches EHEC, les facteurs pour l'adhérence initiale diffuse sont le LPF (Long Polar Fimbriae), Iha (IrgA homologue adhesin), ToxB et également FliC et OmpA [46].

Il existe donc plusieurs adhésines permettant l'adhésion initiale de la bactérie à la cellule hôte.

2.1.2.2 Seconde étape: mise en place du SSTT et attachement intime

Suite à l'attachement initial, il y a mise en place de façon hiérarchique des composants du SSTT [47]. Ce système permet d'injecter directement des facteurs de virulence du cytoplasme bactérien dans le cytoplasme de la cellule hôte, évitant ainsi le milieu extracellulaire. Chez les AEEC, le SSTT est codé par 12 gènes sur l'îlot de pathogénicité LEE. Il comprend des protéines Esc (*E. coli* secretion), qui forment des anneaux dans la membrane interne, le périplasme et la membrane externe de la bactérie et les protéines Esp (EPEC secreted protein), qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire assemblées en aiguille et dans la membrane de l'hôte sous forme de pore. Des protéines régulatrices comme SepL, SepD et CesT, vont d'abord permettre la mise en place des protéines Esc, des protéines Esp ensuite, et enfin des protéines effectrices qui seront injectées dans la cellule hôte. Aucun récepteur spécifique sur la cellule hôte n'est nécessaire pour cette mise en place. L'un des premiers effecteurs injecté dans la cellule eucaryote grâce au SSTT est Tir (Translocated intimin receptor). Cette protéine est le récepteur de l'adhésine bactérienne membranaire nommée intimine et codée par le gène *eae*. Cette liaison adhésine-récepteur permettra un attachement intime de la bactérie avec l'hôte. L'utilisation de son propre récepteur permet à la bactérie d'infecter presque tous les mammifères puisqu'elle ne requiert pas de récepteur spécifique sur la cellule hôte. C'est le premier et seul exemple connu d'une bactérie qui injecte son propre récepteur dans la cellule hôte.

2.1.2.3 Troisième étape: réarrangement du cytosquelette, effacement des microvillosités et formation du piédestal

Les effecteurs ainsi injectés via le SSTT entraînent le réarrangement du cytosquelette cellulaire conduisant à l'effacement des microvillosités et la formation du piédestal qui est une structure dynamique ($0,1 \mu\text{m/s}$) qui peut s'étendre jusqu'à $10 \mu\text{m}$ de hauteur formant un agencement ressemblant à un pseudopode [48] (Figure 3). Le contrôle de la dynamique du cytosquelette est crucial pour plusieurs mécanismes cellulaires comme la cytokinèse, le trafic vésiculaire intracellulaire et la motilité cellulaire [49]. Le cytosquelette est un réseau structuré formé de trois types de filaments: les filaments d'actine, les filaments intermédiaires et les microtubules. Le réseau d'actine est directement responsable du mouvement cellulaire grâce à ses propriétés de polymérisation et dépolymérisation.

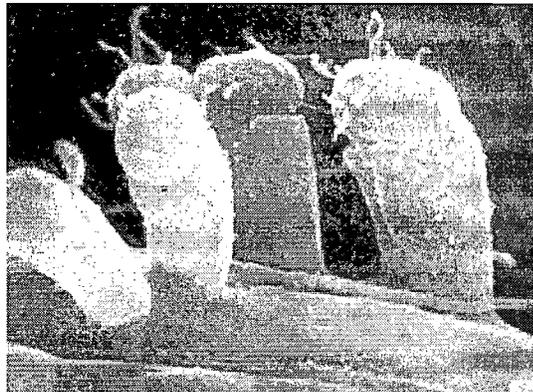


Figure 3: Formation du piédestal observé en microscopie électronique chez une souche EPEC aux cellules HeLa [50].

Pour produire le réarrangement de l'actine, les AEEC doivent activer des protéines de l'hôte comme N-WASP (Neural Wiskott-Aldrich Syndrom Protein) qui, à son tour, active Arp2/3 (Actin related protein complexe). Le recrutement de ces protéines au site d'attachement nécessite d'abord la liaison de Tir à l'intimine [49].

Parmi les AEEC, il existe différents sous-types de Tir. Cependant, une différence majeure est à noter entre les EPEC et les EHEC: le Tir des EPEC est phosphorylé sur un résidu tyrosine par des kinases de l'hôte, contrairement au Tir des EHEC qui n'est pas phosphorylé.

Pour les souches EPEC, il semble exister 3 façons différentes dépendantes de Tir pour induire la réorganisation de l'actine et donc la formation du piédestal:

- suite à la phosphorylation sur le résidu tyrosine Y474 de Tir, il y a activation de la protéine de l'hôte Nck qui active la voie N-WASP (Figure 4A),

- pour certaines souches EPEC, N-WASP est activé par le facteur bactérien Tccp2 injecté, homologue à Tccp (EHEC) qui lui-même a été activé préalablement par Tir non-phosphorylé (Figure 4B). Cette voie est également utilisée par les EHEC via Tccp et/ou Tccp2,

- la dernière façon est indépendante de Nck et Tccp2 mais le mécanisme exacte est encore inconnu (Figure 4C) [51].

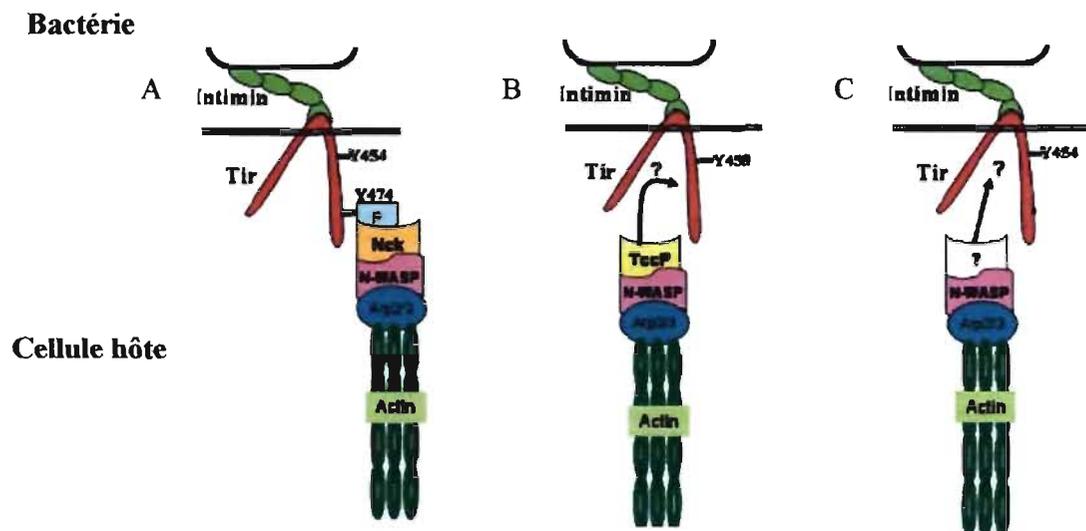


Figure 4: Trois différentes voies utilisées par les AEEC pour réorganiser l'actine. A: activation de la voie N-WASP dépendante de la phosphorylation de Tir et de l'activation de Nck (EPEC); B: activation de N-WASP dépendante de Tccp et/ou Tccp2 (EPEC, EHEC); C: activation de N-WASP indépendante de la phosphorylation de Tir et de l'activation de Tccp (EPEC) [51].

De plus, chez les EPEC, la phosphorylation de Tir sur son résidu tyrosine Y474 entraîne aussi le recrutement d'autres protéines du cytosquelette telles que l' α -actinine, la taline, la vinculine et la cytokératine 18 [52], [53], [54].

La formation du piédestal est aussi dépendante, chez les AEEC, de la protéine cellulaire de l'hôte, la cortactine [55]. De nombreux pathogènes l'utilisent pour moduler le

cytosquelette de la cellule eucaryote. Cette protéine est un régulateur de la nucléation et/ou de la polymérisation du cytosquelette d'actine. Elle possède un domaine acide en N-terminal (NTA), une région comprenant des séquences répétées (F-actin BD), une région portant une hélice α (AHR), une région riche en proline (PRR) et un domaine SH3 (Src homology 3) en C-terminal (Figure 5) [56].

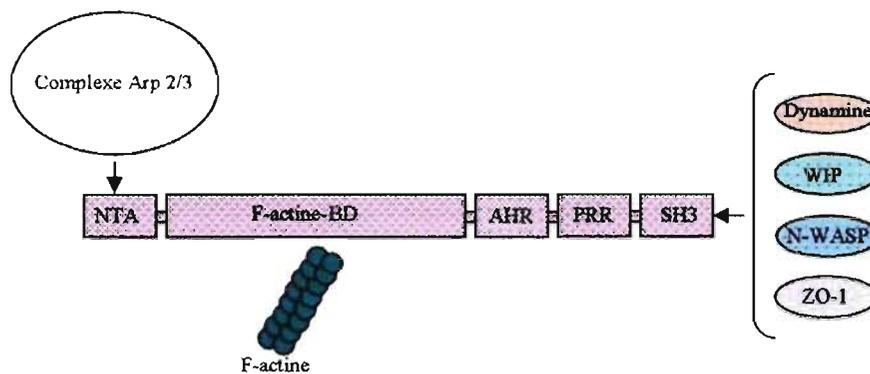


Figure 5: Organisation structurale de la cortactine et les sites de liaison de ses différents partenaires. Adapté de Ben –Ami et *al.* [57].

Le domaine acide N-terminal et la région répétée sont responsables de la liaison avec le complexe Arp2/3 et F-actine respectivement, conduisant ainsi au réarrangement du cytosquelette d'actine. Le domaine SH3 de la cortactine est capable d'interagir avec de nombreuses protéines du cytosquelette comme N-WASP, WIP, la dynamine et des protéines des jonctions serrées (ZO-1). Le mécanisme utilisé par les AEEC pour recruter et activer la cortactine au site d'attachement n'est pas encore connu.

Les EPEC recrutent également la clathrine au site de fixation avec la cellule hôte, pour former la structure en piédestal. Ce recrutement est dépendant de la translocation de Tir dans la membrane de l'hôte mais indépendant de la formation des filaments d'actine. Elle permettrait la polymérisation de l'actine mais le mécanisme exact employé n'est encore pas connu. La clathrine est généralement utilisée pour permettre l'internalisation de la bactérie. Cependant, pour des raisons non élucidées, elle n'enduit pas l'endocytose des EPEC qui sont des bactéries extracellulaires [58].

Les AEEC utilisent donc plusieurs voies de signalisation entraînant le réarrangement du cytosquelette. Cependant des études ont montré que les protéines de la famille Rho, Rac et Cdc42 n'étaient pas impliquées dans la formation du piédestal bien que

ces protéines de l'hôte sont généralement connues pour contrôler la réorganisation de l'actine [59].

Les mécanismes utilisés par les AEEC pour réarranger le cytosquelette d'actine chez l'hôte (effacement des microvillosités et formation du piédestal) sont variés, complexes et encore incomplets. Ces mécanismes ont toutefois été conservés durant la divergence des EHEC et EPEC, ceci suggère que la formation du piédestal est essentiel à la survie et/ou la dissémination de ces pathogènes [60].

2.1.3 Le processus menant à la diarrhée

Les personnes atteintes d'une infection causée par les AEEC peuvent souffrir de nausées, de diarrhée et de légère fièvre. Les symptômes se manifestent pendant deux à dix jours suivant la consommation d'un aliment contaminé.

L'induction de la diarrhée chez l'hôte par les AEEC est multifactorielle. La persistance de la diarrhée serait due entre autres à l'altération de la perméabilité des cellules épithéliales intestinales en perturbant la fonctionnalité des jonctions serrées et du transport des électrolytes (ouverture des canaux). Chez les eucaryotes, la perméabilité des jonctions serrées est régulée par la chaîne légère de myosine (MLC), une protéine de 20 kDa. La MLC peut être phosphorylée soit sur ses résidus sérine soit sur ses résidus tyrosine permettant ainsi la formation de deux types de protéines isoformes. Durant l'infection des EPEC, la MLC est initialement trouvée dans le cytosol de la cellule hôte et est seulement phosphorylée sur ses résidus tyrosine. Au fur et à mesure de la progression de l'infection, la MLC est phosphorylée sur ses résidus sérine. Ces effets sur la phosphorylation de la MLC conduisent à une perturbation des jonctions serrées et à une augmentation de la perméabilité intracellulaire. Cette dernière altère logiquement les mécanismes de transports d'ions, conduit à la rupture de la balance des électrolytes et donc à la diarrhée [61].

L'altération des jonctions serrées résulte également en la relocalisation, la redistribution des protéines transmembranaires des jonctions serrées comme les claudines 1, 3 et 5, essentielles dans la fonction de barrière, et l'intégrine $\beta 1$ [24]. Des études réalisées chez *Citrobacter rodentium*, une autre bactérie pathogène capable de causer des lésions A/E, ont montré pour la première fois que, lors de l'infection chez des souris, il y a redistribution et non dégradation des claudines 3 dans le colon [62]. Ces effets sont dépendants des protéines effectrices EspF et Map, injectées dans le cytoplasme de la cellule

épithéliale intestinale via le SSTT. Mais le mécanisme par lequel ces protéines altèrent les jonctions serrées est encore inconnu. Ainsi, la rupture des jonctions serrées permet le passage du contenu du côté basolatéral dans le compartiment apical découlant en inflammation et diarrhée. Un mouvement passif d'eau et d'ions se produit alors dans le lumen intestinal [63, 64].

Par ailleurs, l'intervention d'effecteurs comme EspG et EspF altèrent la localisation cellulaire des aquaporines [65]. Les aquaporines sont des canaux hydriques de nature protéique qui traversent la membrane cellulaire et permettent ainsi un échange rapide de molécules d'eau entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire.

L'induction de la diarrhée chez l'hôte par les AEEC est donc due à plusieurs facteurs. Les mécanismes sont complexes et encore en cours d'étude.

2.2 *Citrobacter rodentium*

Les *Citrobacter* spp (famille des *Enterobacteriaceae*) sont des commensaux du tube digestif de l'homme et des animaux mais ils sont rarement responsables d'infections excepté chez les sujets immunodéprimés.

Toutes les souches pathogènes de *C. rodentium* ont été isolées chez la souris où elles provoquent une hyperplasie du colon. La transmission se fait par voie féco-orale, atteint principalement les jeunes animaux et se traduit par un état de prostration, une anorexie, un retard de croissance, un poil piqué, une légère déshydratation et, dans environ 10 à 15 % des cas, par un prolapsus rectal [66]. L'examen de l'épithélium intestinal en microscopie électronique révèle des lésions A/E tout à fait semblables à celles produites par les souches AEEC et la bactérie possède un locus homologue au LEE [67], [68]. *C. rodentium* fait ainsi partie des pathogènes formant des lésions A/E.

Pour l'étude des AEEC, les modèles *in vivo* sont difficiles à mettre au point. *C. rodentium*, contrairement aux AEEC, a l'avantage de causer des lésions A/E dans le modèle murin. La moitié des articles scientifiques présents dans la littérature concernant *C. rodentium* ont été publiés durant ces trois dernières années. Il constitue actuellement le meilleur modèle pour l'étude la pathogénicité des AEEC.

Le génome de la souche *C. rodentium* ICC168 a été séquencé (http://sanger.ac.uk/Projects/C_rodentium/) et permet ainsi de pouvoir comparer les facteurs de virulence avec les autres souches AEEC dont le génome est connu tel que les

souches EHEC O157:H7 EDL933 et Sakai. On a ainsi qu'il n'existe aucun homologue au gène *paa* chez *C. rodentium* ICC168.

2.3 *Hafnia alvei*

Bactérie de la flore digestive humaine et animale, elle est présente également dans l'environnement (le sol et l'eau). *Hafnia alvei* peut se comporter chez l'homme comme une bactérie pathogène opportuniste. Elle est rarement isolée, le plus souvent en milieu hospitalier et en association avec d'autres bactéries, lors de septicémies, de gastro-entérites, de pneumonies, d'abcès, d'infections urinaires et de plaies infectées. En 1991, Albert *et al.* ont isolé ce germe, en culture pure, d'un cas de diarrhée infantile. Ces auteurs ont montré que la souche était douée d'un pouvoir pathogène chez le lapin. En effet, elle est capable d'adhérer à l'épithélium intestinal, provoquant ainsi une perte des villosités de l'iléon et du colon. Ceci mène à la formation de lésions dans la muqueuse comparables à celles provoquées par les AEEC. Par contre, cette souche ne produit pas de toxine et ne possède pas de pouvoir invasif *in vitro* (cellules HeLa) ou *in vivo* [69]. Par la suite, une autre équipe a montré que les souches de *H. alvei* contiennent des gènes similaires à ceux du LEE, îlot présent chez les AEEC [70]. Contrairement à *C. rodentium*, aucun modèle animal n'a été mis au point avec *H. alvei* pour étudier la pathogénicité des AEEC.

3 Les déterminants génétiques impliqués dans la virulence des AEEC

3.1 Le LEE

3.1.1 Généralités

Les gènes de virulence sont souvent organisés soit en grands blocs dans le génome, appelés îlots de pathogénicité, soit au sein de larges plasmides. Ils sont fréquemment transmis horizontalement par des phages ou d'autres éléments mobiles d'une espèce bactérienne à une autre ou au sein même d'une seule espèce bactérienne [10].

La majorité des gènes de virulence des AEEC sont portés par un îlot de pathogénicité particulier: le LEE situé sur le chromosome. Les îlots de pathogénicité sont définis comme suit [71]:

- ils sont généralement absents des bactéries non pathogènes appartenant à la même espèce,
- ils sont constitués d'un groupe de gènes de virulence, dont des gènes codant pour des toxines, des adhésines, des invasines, des systèmes chélateurs de fer, et des systèmes d'export de facteurs de virulence,
- leur pourcentage G+C est différent de celui du reste du chromosome,
- ils occupent généralement une région chromosomique de plus de 30 kb, mais leur taille peut varier de 5 à 200 kb,
- ils portent des gènes codant pour des intégrases d'origine phagique, des transposases, avec des origines de répllication plasmidiques, souvent cryptiques. La présence de ces gènes suggèrent un système d'intégration de l'ADN étranger par l'intermédiaire de transposons, d'intégrons, de phages ou de plasmides, laissant également supposer une grande mobilité de certains îlots de pathogénicité.

Le LEE, désigné ainsi vu son implication dans la formation des lésions A/E au niveau des entérocytes intestinaux, a été découvert en 1995 par McDaniel et *al.* chez des souches A/E comme les EPEC, EHEC et *H. alvei*. Il est divisé en cinq opérons (LEE1 au LEE5) (Figure 6) et code pour des protéines qui peuvent être classées en six catégories principales comprenant les régulateurs transcriptionnels, les protéines Esc, les protéines Esp, les protéines chaperones, les protéines effectrices sécrétées et une adhésine (l'intimine) [42]. La localisation du LEE varie en fonction des lignées phylogénétiques et des sérotypes. Chez les EPEC, le LEE (35,6 kb) possède 41 cadres de lecture ouverts et un pourcentage en G+C de 38% contrairement au chromosome d'*E. coli* dont le contenu est de 50,8%. Le LEE est inséré au niveau de *selC*, locus pour l'ARNt de la sélénocystéine. Lorsqu'on introduit le LEE_{EPEC} chez la souche *E. coli* K-12 (souche de laboratoire non pathogène ayant le plasmide EAF), cette souche acquiert la capacité de produire des lésions de type A/E. Ceci indique que le LEE_{EPEC} est nécessaire et même suffisant à la production du phénotype A/E [72]. Chez les EHEC, le LEE, de 43,3 kb, possède 54 cadres de lecture ouverts, soit 13 de plus que les EPEC, et présente 94% d'homologie en aa avec les protéines codées par le LEE_{EPEC}. Grâce au génome de la souche EHEC O157:H7 EDL933,

on sait que le LEE est localisé sur l'îlot OI#148 et qu'il est inséré au niveau de *selC* et *yicL*, putatif transporteur. Contrairement au LEE_{EPEC}, le LEE_{EHEC} cloné chez une souche K-12 ne rend pas cette souche capable de produire des lésions de type A/E [73]. Ceci indique que les différences observées au niveau du LEE ont leur importance dans la pathogénicité. Aujourd'hui on sait que les mécanismes de régulation sont différents et que la présence d'autres facteurs de virulence codés en dehors du LEE est nécessaire.

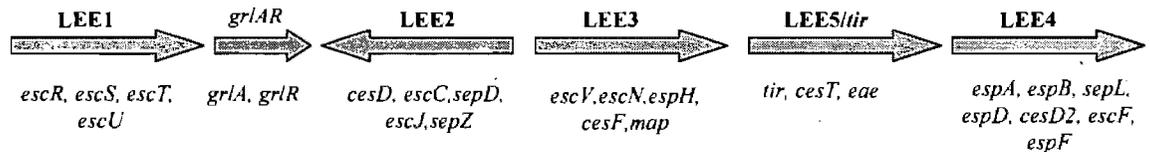


Figure 6: Organisation génétique du LEE portant les gènes codants pour les facteurs de virulence chez les AEEC. Adapté de Garmendia et al [47].

3.1.2 Les déterminants présents sur LEE

Le LEE code pour plusieurs protéines dont l'adhésine intimine, les protéines Esc (*E. coli*-secreted proteins) formant le corps basal du SSTT, EspA formant le filament du SSTT, EspB et EspD formant les translocateurs du SSTT, quelques effecteurs, des protéines chaperonnes nommées Ces (Chaperone of *E. coli* secreted) et des protéines régulatrices. L'organisation génétique du LEE est résumée dans le tableau I.

Tableau I. Comparaison entre le LEE de la souche EPEC EcL1001 et le LEE de la souche EHEC O157:H7 EDL933. ND: Non Déterminé.

| Opéron | Gène | Protéine | Fonction | Localisation | EPEC porcin ECL1001 | EHEC O157:H7 EDL933 |
|--------|--------------------|-------------|--|-------------------------------|---------------------|---------------------|
| | <i>yicL</i> | inconnue | Transporteur perméase putatif | inconnue | ND | Oui |
| | <i>rorf1</i> | inconnue | Fonction inconnue | inconnue | Oui | Oui |
| | <i>rorf2</i> | EspG | Modulation du cytosquelette | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| LEE1 | <i>orf1</i> | Ler | Régulateur spécifique du LEE1, 2, 3, 4 chez EHEC LEE1, 2, 3, 4 et 5 chez EPEC | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>orf2</i> | EscE | Interagit avec SepL | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>orf3</i> | CesAB | Chaperonne d'EspA et EspB | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>orf4</i> | ?? | Pas de rôle dans la sécrétion et la formation du piédestal | inconnue | Oui | Oui |
| | <i>orf5</i> | EscL | Lie et régule l'activité de l'ATPase EscN | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>escR</i> | EscR | Composant de l'anneau de la membrane interne bactérienne | Membrane interne bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>escS</i> | EscS | Composant de l'anneau de la membrane interne bactérienne | Membrane interne bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>escT</i> | EscT | Composant de l'anneau de la membrane interne bactérienne, associé avec EscU, sa partie C-terminale est cytoplasmique | Membrane interne bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>escU</i> | EscU | Composant de l'anneau de la membrane interne bactérienne | Membrane interne bactérienne | Oui | Oui |
| | Rorf3 | <i>rorf</i> | EtgA | inconnue | inconnue | Oui |
| GrlAR | <i>orf10, grIR</i> | GrlR | Active la transcription de <i>ler</i> | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>orf11, grIA</i> | GrlA | Inhibe GrlA | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |

| Opéron | Gène | Protéine | Fonction | Localisation | EPEC porcin ECL1001 | EHEC O157:H7 EDL933 |
|--------|----------------------------------|----------|---|--|---------------------------|---------------------------|
| LEE2 | <i>cesD</i> | CesD | Chaperonne d'EspD et EspB | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>escC</i> | EscC | Composant de l'anneau de la membrane externe bactérienne | Membrane externe bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>rorf6</i> | SepD | Régule la sécrétion des effecteurs et composants du SSTT avec SepL | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>escJ</i> | EscJ | Composant de l'anneau périplasmique bactérien | Périplasma | Oui | Oui |
| | <i>rorf8</i> | EscI | Composant de l'anneau de la membrane interne bactérienne interagit avec EscU | Membrane interne bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>sepZ</i> | SepZ | Inconnue | Cytoplasme de la cellule hôte | ND | Oui |
| LEE3 | <i>orf12</i> | inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| | <i>escN</i> | EscN | ATPase du SSTT | Cytoplasme et membrane interne bactérien | Oui | Oui |
| | <i>escV</i> | EscV | Composant de l'anneau de la membrane interne bactérienne | Membrane interne bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>orf15</i> | inconnue | inconnue | inconnue | Oui | Oui |
| | <i>orf16</i> | Inconnue | inconnue | inconnue | ND | Oui |
| | <i>sepQ</i> , (<i>escQ</i>) | SepQ | Interagit avec EscL, composant de l'anneau interne bactérien | Membrane interne bactérienne | ND | Oui |
| | <i>orf18</i> | EspH | Modulation du cytosquelette d'actine | Cytoplasme de la cellule hôte | ND | Oui |
| | <i>cesF</i> | CesF | Chaperonne d'EspF | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |

| Opéron | Gène | Protéine | Fonction | Localisation | EPEC porcin ECL1001 | EHEC O157:H7 EDL933 |
|------------------|--------------|---------------|---|-------------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| LEE3 | <i>orf19</i> | Map | Rôle dans l'apoptose, la formation d'extensions comme les filopodes, l'altération des jonctions serrées | Cytoplasme de la cellule hôte | ND | Oui |
| LEE5/ <i>tir</i> | <i>tir</i> | Tir (EspE) | Récepteur de l'intimine et initie la polymérisation d'actine | Membrane externe de la cellule hôte | Oui | Oui |
| LEE5/ <i>tir</i> | <i>cesT</i> | CesT | Chaperonne de Tir, Map, NleA, NleH, NleF, EspH, EspZ, EspG, EspF et NleG | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>eae</i> | Intimine | Adhésine liant son propre récepteur Tir | Membrane externe bactérienne | Oui | Oui |
| LEE4 | <i>escD</i> | EscD | Composant de la membrane interne bactérienne | Membrane interne bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>sepL</i> | SepL | Régule la sécrétion des composants du SSTT avec SepD | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>espA</i> | EspA | Aiguille du SSTT, rôle dans l'adhésion bactérienne | Pont entre la bactérie et l'hôte | Oui | Oui |
| | <i>espD</i> | EspD | Formation du pore dans la membrane de la cellule hôte | Membrane de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | <i>espB</i> | EspB | Formation du pore dans la membrane de la cellule hôte et facteur anti-phagocytaire | Membrane de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | <i>orf27</i> | EscD2 | Protéine chaperonne d'EspD | Cytoplasme bactérien | Oui | Oui |
| | <i>escF</i> | EscF | Permet connection entre EscC et EspA | Membrane externe bactérienne | Oui | Oui |
| | <i>orf29</i> | Inconnue | Inconnue | inconnue | Oui | Oui |
| | <i>espF</i> | EspF | Rôle dans l'apoptose, la modulation du cytosquelette d'actine et l'altération des jonctions serrées | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | Z5098 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |

| | | | | | |
|-------------|----------|--------------------|-------------------------------|----|-----|
| Z5097 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| Z5096 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| Z5095 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| Z5094 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| Z5093 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| Z5092 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| Z5091 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| Z5089 | Z5089 | Transposase | Cytoplasme de la cellule hôte | ND | Oui |
| Z5088 | Inconnue | Fonction inconnue | inconnue | ND | Oui |
| <i>intL</i> | IntL | Intégrase putative | Cytoplasme de la cellule hôte | ND | Oui |
| <i>selC</i> | / | ARN de transfert | Cytoplasme de la cellule hôte | ND | Oui |

3.1.2.1 L'adhésine intimine

Le gène *eae* (*E. coli* attaching and effacing), situé sur le LEE5, fut le premier gène découvert et associé à la formation des lésions A/E en 1990 chez une souche EPEC. Il code une protéine de la membrane externe de 94 kDa appelée intimine, homologue à l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* [74]. L'intimine est une adhésine requise pour l'attachement intime de la bactérie à la cellule hôte [75]. De récentes analyses biochimiques montrent que l'intimine possède un domaine LysM en N-terminal qui permet la liaison et l'ancrage dans la membrane externe en formant un tonneau β (Figure 7) [76]. La fonction d'attachement à l'épithélium de l'intimine est assurée par les 280 acides aminés situés dans la région C-terminale de la protéine, contenant deux domaines "IgG-like" et un domaine "C-type lectin-like" [77] [78].

Il existe 21 sous-types d'intimine associés aux AEEC [79]. Le domaine N-terminal de la protéine responsable de l'insertion dans la membrane externe est hautement conservé contrairement au domaine C-terminal très variable. Les différents sous-types antigéniques de l'intimine sont donc dûs aux différences dans le domaine C-terminal, en particulier le domaine de liaison avec le récepteur. L'intimine est capable de se lier à des récepteurs codés par la cellule hôte (Hir, host-cell-encoded receptor(s)). L'interaction des différents types d'intimine avec Hir explique le tropisme tissulaire observé entre les souches AEEC [80]. Le sous-type α de l'intimine est, par exemple, généralement retrouvé chez les EPEC tandis que les intimines γ et ϵ sont retrouvées chez les EHEC et l'intimine β , à la fois chez les EPEC et les EHEC.

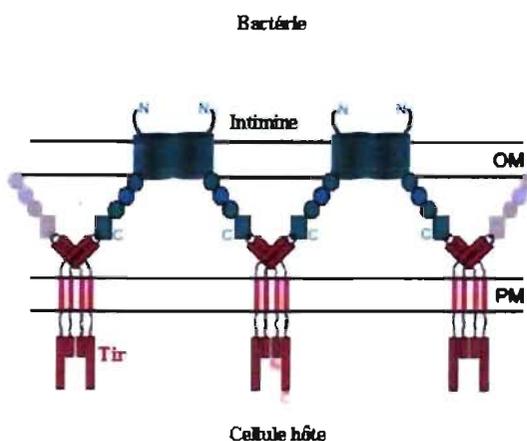


Figure 7: Liaison de l'intimine avec son récepteur Tir. Figure adaptée de Touze et al. [76].

Le récepteur spécifique pour cette adhésine est Tir, effecteur injecté par la bactérie dans la cellule hôte via le SSTT. La liaison intimine-Tir permet l'activation de ce dernier, ce qui entraîne une cascade d'activation menant à la réorganisation de l'actine (paragraphe 3.1.2.3.1.1). La région centrale conservée et ancrée dans la membrane externe bactérienne s'oligomérisent pour former un dimère d'intimine et ainsi favoriser une meilleure interaction avec Tir (Figure 7). L'activation de la cascade dépendante de Tir est alors plus rapide [76].

L'intimine peut aussi interagir, dépendamment du sous-type, avec des récepteurs de l'hôte tel que la β 1-intégrine (comme le fait l'invasine de *Yersinia*), une protéine transmembranaire des cellules eucaryotes, ou la nucléoline, une des protéines majoritaires du nucléole mais également présente à la surface cellulaire [81], [82], [83]. Une étude réalisée avec la souche EHEC O157:H7 *in vivo* montre que la nucléoline et la β 1-intégrine se situent au niveau du site d'attachement de la bactérie et pourraient donc interagir avec l'intimine [84]. Une des hypothèses émise par ces chercheurs veut qu'il y ait une compétition entre Tir, la nucléoline et la β 1-intégrine pour la liaison avec l'intimine. La liaison de l'intimine avec la nucléoline et la β 1-intégrine permettrait une dissémination de la bactérie. Par la suite, un contact plus tardif de l'intimine avec Tir permettra une forte adhérence à l'hôte [83].

L'intimine semble être une protéine multifonctionnelle puisqu'elle serait également responsable de l'activation et non de l'injection de deux effecteurs du SSTT, Map et EspF, qui induisent la rupture des barrières épithéliales. Cette activation ne nécessite pas la présence Tir mais uniquement celle de l'intimine [85]. L'intimine se lierait donc à un autre récepteur que Tir pour activer ces deux effecteurs: la nucléoline et/ou la β 1-intégrine et/ou un nouveau récepteur inconnu à ce jour.

Le rôle joué par l'intimine dans les infections dues aux EHEC ou aux EPEC est essentiel à la pathogénicité et en fait une cible pour différents vaccins.

3.1.2.2 Le système de sécrétion de type III

À ce jour, seules les bactéries à Gram négatif des plantes, des animaux, des insectes et des humains, comme *Yersinia spp*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Xanthomonas spp.*, *Erwinia spp.*, possèdent le SSTT. Il est donc associé aux interactions avec les organismes eucaryotes [86]. Le SSTT agit comme une seringue macromoléculaire, en injectant directement des protéines effectrices dans les cellules hôtes,

échappant ainsi au système immunitaire. L'organisation structurale du SSTT ressemble à celle des flagelles. Beaucoup d'hypothèses sont encore émises à l'heure actuelle concernant l'évolution et/ou la relation entre ces deux systèmes bactériens.

Chez les AEEC, le SSTT est codé par le LEE et fut donc découvert en même temps [87]. Une douzaine de gènes présents sur le LEE sont nécessaires pour sa biogenèse (protéines Esp et Esc) (Figure 8). Il semblerait qu'il y ait une séquence signal commune à tous les effecteurs, mais aucun consensus n'est actuellement accepté par tous les chercheurs. Néanmoins, une étude réalisée chez *Yersinia* montre que les protéines effectrices présentent une séquence N-terminale amphipatique contenant 4 à 5 résidus sérine qui jouerait le rôle de séquence signal [88]. La présence de cette séquence n'a pas été vérifiée chez les AEEC.

Une signalisation existe aussi pour la mise en place du SSTT. Son établissement est organisé de façon hiérarchique, avec d'abord la mise en place du corps basal, puis du filament EspA (aiguille) et enfin des translocateurs.

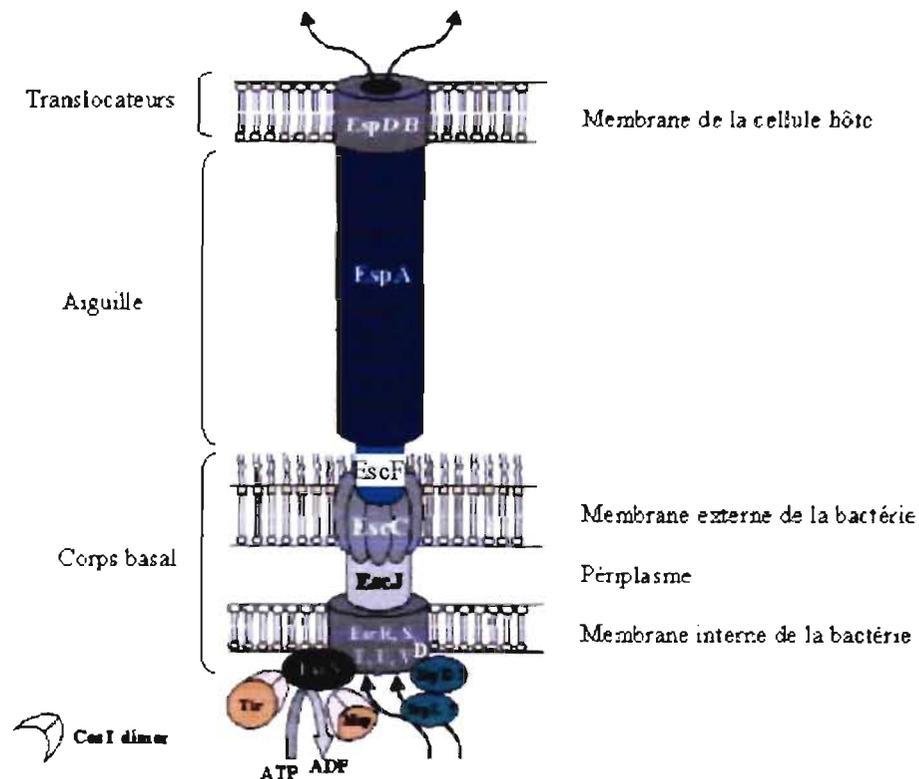


Figure 8: Structure du système de sécrétion de type III chez les EPEC/EHEC. Présence du corps basal, du filament EspA (aiguille) puis des translocateurs EspB et EspD. Adapté de Garmendia et al. [47].

3.1.2.2.1 Le corps basal

Les protéines composant le corps basal du SSTT sont appelées les protéines Esc (*E. coli*-secreted proteins) et sont codées sur les opérons LEE1, 2 et 3. Elles forment les anneaux dans la membrane interne, puis dans le périplasma et enfin dans la membrane externe bactérienne. L'anneau présent dans la membrane interne est composé de six protéines: EscR, EscS, EscT, EscU, EscD, et EscV (Figure 8). EscV, protéine majoritaire, possède une séquence signal et lui permettant d'être sécrétée via le système Sec [47]. On ne sait pas encore comment ces protéines s'assemblent pour former l'anneau mais on sait que EscR possède quatre domaines transmembranaires et qu'il interagit avec lui-même ainsi que EscS et EscU [89]. Par contre, EscS semble avoir seulement deux segments transmembranaires, tandis que EscU possède quatre segments transmembranaires en N-terminal et mais aussi un domaine C-terminal impliqué dans l'aiguillage spécifique des substrats. Ces protéines qui composent l'anneau dans la membrane interne sont les plus conservées parmi les différentes souches possédant le SSTT.

L'anneau périplasmique est une structure cylindrique de 1.8 Å formée par la protéine EscJ, dont la sécrétion est dépendante du système Sec (Figure 8) [90].

Enfin, l'anneau situé dans la membrane externe bactérienne est formé de l'assemblage de monomères de la protéine EscC, appartenant à la famille des sécrétines et sécrétée via le système Sec dans le périplasma (Figure 8) [91]. La sécrétion d'EscC semble être aussi dépendante de deux protéines du SSTT, EscN (ATPase) et EscV. En effet, la protéine EscC, initialement retrouvée dans la membrane externe, se retrouve dans le périplasma chez des mutants *escN* et *escV* [91]. Ceci indique que l'insertion dans la membrane externe de la protéine EscC est dépendante du système Sec et du SSTT.

Après la mise en place du corps basal, il y a formation du filament EspA (aiguille). Le lien entre l'anneau de la membrane externe du SSTT (EscC) et le filament EspA n'est toutefois pas direct et nécessite la présence de la protéine EscF. Cette protéine de 8 kDa est nécessaire à la mise en place du complexe aiguille et à la sécrétion des protéines Esp puisqu'elle se lie à EspA via sa partie N-terminale [92]. Il s'agit peut-être de la première protéine sécrétée via le corps basal du SSTT, car elle ne présente pas de séquence signal Sec dépendant comme EscJ et EscC.

3.1.2.2 L'aiguille: le filament EspA

Le gène *espA*, présent sur le LEE4, code une protéine de 25 kDa, EspA, seule composante du filament formé lors de la mise en place du SSTT par la bactérie (Figure 8). Ce filament est construit dans le milieu extracellulaire et consiste en un tube hélicoïdal de 120 Å (12 nm) de diamètre contenant un canal central de 25 Å (2,5 nm) de diamètre. Sa longueur peut varier entre 30 et 700 nm, dépendamment de la quantité de protéine EspA intracellulaire disponible. Il est synthétisé par l'ajout de monomères d'EspA, facteur limitant, à l'extrémité du filament en croissance. On dénombre environ 5,6 sous-unités d'EspA par tour [93], [94], [92], [95], [96]. L'assemblage des sous-unités EspA s'apparente à celui des sous-unités FliC dans la mise en place du flagelle. Les sous-unités naissantes sont ajoutées à l'extrémité du filament en croissance. L'interaction des protéines EspA entre elles est dépendante de leur région C-terminale. Des études récentes ont néanmoins montré que la région N-terminale, en plus de permettre la stabilité de la protéine en interagissant avec sa chaperonne cytoplasmique CesAB (paragraphe 3.1.2.4) elle intervient dans la biogenèse et la fonction du filament EspA [97]. Chez les AEEC, le système d'assemblage des protéines EspA est le même. En effet, les sous-unités EspA_{EPEC} et EspA_{EHEC} sont capables de se co-assembler dans une seule bactérie formant ainsi un filament chimérique [95].

Les études réalisées sur la structure secondaire adoptée par EspA lors de mise en place du filament montre que les sous-unités s'oligomérisent à pH neutre, tandis qu'à pH acide, elles adoptent un changement de conformation (la protéine est partiellement dépliée) entraînant une dissociation des oligomères [98].

Une fois synthétisé, le filament EspA semble agir à différents niveaux. L'un de ses rôles est la translocation des protéines effectrices au travers de son canal central. Le passage de l'effecteur Tir, récepteur à l'intimine, dans le filament EspA mature a permis de confirmer son rôle d'aiguille [97]. Il est également impliqué dans la formation des microcolonies sur les cellules épithéliales, dans l'agrégation des bactéries ainsi que lors de la formation de biofilms sur des surfaces abiotiques [99]. Il semble avoir un rôle d'adhésine [93, 100]. Cependant, un attachement intime de la bactérie avec l'hôte est essentiel pour qu'il y ait translocation des effecteurs, car l'adhésion médiée par EspA est faible. Grâce à ce rôle d'adhésine, le filament est la cible potentielle pour des vaccins.

Une fois l'assemblage du filament EspA terminé, les translocateurs, EspB et EspD sont mis en place.

3.1.2.2.3 Les translocateurs: EspB (EaeB) et EspD

Les gènes *espB* et *espD* sont situés sur l'opéron LEE4 et codent respectivement pour les protéines EspB de 37 kDa et EspD de 40 kDa (Figure 8). Ces protéines, sécrétées via le SSTT en formation, se situent à l'extrémité du filament EspA et s'insèrent dans la membrane de la cellule hôte en formant un pore de 3 à 5 nm de diamètre [101]. Ceci complète la mise en place du SSTT.

EspB (312 résidus) est une protéine bifonctionnelle: elle est retrouvée à la fois dans la membrane et dans le cytosol de la cellule hôte où elle module le cytosquelette d'actine [102]. EspB interagit avec EspA [103] et EspD [101] permettant ainsi la mise en place fonctionnelle du SSTT. Son domaine transmembranaire putatif (99 à 118 résidus) permet la formation du pore dans la membrane de l'hôte. EspB peut aussi interagir avec différentes protéines cellulaires comme l' α -caténine, protéine du cytosquelette de l'hôte [104] et l' α -antitrypsine [105]. Ces protéines variant de part leur composition et leur taille, EspB possède donc plusieurs domaines permettant ces interactions diverses. Par exemple, les résidus 118 à 220 d'EspB semblent être impliqués à la fois dans la translocation efficace de la protéine et dans son interaction avec EspA. Sa région C-terminale (217 à 312 résidus) est impliquée dans l'adhérence bactérienne tandis que sa région N-terminale, chez une souche EHEC, interagit directement avec l' α -caténine [106]. Cette interaction n'a pas encore été démontrée chez les EPEC mais l' α -caténine est recrutée malgré tout pour la formation du piédestal [107]. EspB interagit aussi, via son domaine N-terminal, avec la protéine cellulaire α -antitrypsine, inhibant sa fonction lui permettant de former le pore. En 2007, un nouveau partenaire d'EspB fut découvert, il s'agit de la protéine cellulaire myosine-LC, qui lui confère son activité anti-phagocytaire. Par son domaine N-terminal (résidus 159 à 218), EspB se lie à la myosine et inhibe l'interaction de cette dernière avec l'actine et son implication dans l'activité phagocytaire [108].

EspD est une protéine multifonctionnelle, car elle influence la longueur du filament EspA, elle est induite dans l'adhésion durant les étapes précoces de l'infection et elle est nécessaire dans la formation du pore. Grâce à ses deux segments transmembranaires

putatifs, elle est retrouvée ancrée dans la membrane plasmique de la cellule hôte [109]. Son domaine C-terminal lui permet d'interagir avec une autre protéine EspD [110, 111], [95].

Une fois les translocateurs placés, le SSTT peut sécréter les effecteurs. Le SSTT est un système de transport actif qui nécessite la présence d'une ATPase, la protéine cytoplasmique EscN, dont le gène *escN* est présent sur l'opéron LEE3. En hydrolysant l'ATP, il y a libération d'énergie permettant ainsi au SSTT d'injecter les effecteurs dans le cytoplasme de l'hôte [112]. EscN s'oligomérisse sous forme d'un hexamère avec à son centre un pore chargé négativement. Ce dernier permet le passage des protéines du SSTT sous forme non repliées. La force protomotrice (diffusion des ions H⁺ à travers la membrane) fournit l'énergie nécessaire à ce passage [112].

3.1.2.3 Les effecteurs du SSTT

Grâce à l'énergie fournie par l'ATPase EscN, six molécules effectrices codées par le LEE et une dizaine d'effecteurs codés en dehors du LEE seront injectés. Nous étudierons dans un premier temps, les effecteurs codés par le LEE, classés selon leur fonction. On retrouve ainsi des effecteurs responsables de la modulation du cytosquelette d'actine, ceux qui agissent au niveau des mitochondries et enfin ceux dont la fonction est encore inconnue. Les effecteurs codés en dehors du LEE seront ensuite détaillés au paragraphe 1.1.2.4.

3.1.2.3.1 Les effecteurs responsables de la modulation du cytosquelette de l'hôte

3.1.2.3.1.1 Tir (EspE, Hp90)

Tir fut découvert en 1992 chez des cellules eucaryotes infectées par des souches EPEC [113]. Il était considéré au début comme une protéine de l'hôte, d'où son nom Hp90 (Host protein). C'est suite à la découverte du LEE et du SSTT que des études ont montré, en 1997, qu'il s'agissait d'une protéine bactérienne injectée dans la cellule hôte via le SSTT. Hp90 fut identifié comme le récepteur spécifique de l'adhésine bactérienne intimine, et fut alors renommé Tir pour Translocated Intimin Receptor [114]. Cette découverte a introduit un concept révolutionnaire où la bactérie produit et injecte son propre récepteur chez la cellule hôte. Ce concept semble être unique aux pathogènes A/E.

Codée par le gène *tir* présent sur l'opéron LEE5, Tir est introduit grâce au SSTT dans le cytoplasme de la cellule eucaryote infectée. Il s'insère dans la membrane cytoplasmique, grâce à ses deux domaines transmembranaires orientés vers le cytosol, (Figure 7) [115]. Une fois dans la membrane de l'hôte, il interagit avec l'intimine via sa région centrale en forme de boucle reliant les deux domaines transmembranaires entre eux et exposée à la surface. Il induit alors, par différentes cascades d'activation selon les souches AEEC, la réorganisation de l'actine.

Une étude a montré que Tir_{EHEC} et Tir_{EPEC} ne sont pas interchangeable [116]. En effet, lorsqu'on introduit Tir_{EHEC} chez une souche EPEC, il n'y a pas polymérisation de l'actine, mais Tir_{EPEC} entraîne malgré tout un réarrangement de l'actine lorsqu'il est introduit chez une souche EHEC. Ceci souligne la présence de mécanismes différents employés par ces deux pathotypes pour entraîner le réarrangement du cytosquelette via Tir. Grâce à de récentes études, on connaît davantage les différences entre Tir_{EPEC} et Tir_{EHEC}.

Tir_{EPEC}, par son domaine N-terminal, lie de nombreux facteurs cellulaires impliqués dans la réorganisation de l'actine comme l' α -actinine, la vinculine, la taline et la cortactine, mais également des tyrosines kinases de la famille de Tec et Abl nécessaires à la formation du piédestal [49]. De plus, sa région C-terminale contient deux résidus tyrosines essentiels Y474 et Y454, qui contrôlent l'assemblage et la localisation de l'actine sous le site d'attachement de la bactérie [117]. Cette région est suffisante pour générer la formation du piédestal en absence de tout autre effecteur chez les EPEC. Après la translocation de Tir et son interaction avec l'intimine, des protéines tyrosines kinases de l'hôte, comme la protéine SFK c-Fyn (Tec et Abl), phosphorylent le résidu tyrosine Y474 de Tir générant ainsi un site de liaison pour le domaine SH2 (Src Homology 2) de Nck, protéine adaptatrice de l'hôte. La protéine c-Fyn de l'hôte est surtout présente dans les radeaux lipidiques tout comme Nck. Ceci signifierait que Tir s'insère dans des régions riches en radeaux lipidiques de la membrane de l'hôte [118], [119], [120], [121]. La voie Nck entraîne une cascade d'activation menant à la réorganisation de l'actine (paragraphe 2.1.2.3). Le résidu Y454 est aussi important pour la réorganisation de l'actine, il agit indépendamment de l'activation de Nck, mais de façon encore inconnue.

Tir_{EHEC} ne possède pas de résidu équivalent à la tyrosine Y474 et médie un réarrangement de l'actine de façon Nck-indépendante. Toutefois, EHEC injecte, via le SSTT, une protéine adaptatrice Tccp (EspFu) ou son homologue Tccp2 (paragraphe 3.2.2.2.2) qui lierait Tir_{EHEC} à la dynamique de l'actine, entraînant ainsi la polymérisation

de l'actine et la formation du piédestal [49], [122], [123]. Tccp semble imiter la protéine cellulaire Nck utilisée par les EPEC. On pensait, jusqu'en 2004 que les souches EHEC et EPEC induisaient la réorganisation de l'actine par des cascades différentes et que le mécanisme utilisant la voie Tccp était propre aux EHEC. Or certaines souches EPEC possèdent ce facteur Tccp (EPEC O119:H6) ou Tccp2. Ces souches entraîneraient donc également la réorganisation de l'actine via la voie Tccp utilisée par les EHEC, en plus des autres voies utilisées par les EPEC. Il semblerait que le résidu Y458 chez les EHEC O157, qui équivaut au résidu Y454 des EPEC, soit responsable de l'activation de Tccp et/ou Tccp2 et entraîne la polymérisation de l'actine de façon Nck-indépendante. Ces résidus font partie de la séquence asparagine-proline-tyrosine (NPY) [124]. Cette séquence NPY semble être fortement conservée parmi les AEEC. Les EHEC et EPEC partageraient donc une voie commune pour la polymérisation de l'actine [60].

En conclusion, Tir a deux rôles importants chez les AEEC: premièrement, il lie l'intimine et ensuite il initie la nucléation et la polymérisation de l'actine par différentes voies de signalisations pour former la structure en piédestal [125].

3.1.2.3.1.2 EspG et EspG2

EspG et EspG2 sont sécrétées par le SSTT et sont codées par le gène *espG* présent en amont de l'opéron LEE1 et le gène *espG2* présent sur l'îlot de pathogénicité *espC*. EspG2 ne fait pas partie du LEE, mais peut-être groupé avec EspG car il s'agit de protéines semblables au niveau structurel et fonctionnel. Ces protéines interviennent dans l'étape précoce de la colonisation, en entraînant la formation des fibres de stress d'actine et en induisant la destruction des microtubules sous le site d'attachement de la bactérie, de manière indépendante à l'interaction Tir-intimine. Les microtubules sont composés majoritairement de tubuline. Les réseaux de microtubules sont les composants majeurs du cytosquelette de la plupart des cellules eucaryotes et sont responsables de la mitose, du mouvement des organelles et de la dynamique d'actine. Le mécanisme d'action exact d'EspG et EspG2 n'est pas clairement connu. On sait qu'elles interagissent directement avec l' α -tubuline et activent la voie RhoA-ROCK pour déstabiliser les microtubules [126] [127]. Elles semblent également interagir avec le facteur d'échange de nucléotide de guanine (GEF-H1), qui permet la destruction des microtubules. GEF-H1 est présent dans le réseau de microtubules sous forme inactive. Lorsqu'il est relâché dans le cytosol grâce à

EspG et EspG2, il est activé. Il induit alors la voie de signalisation RhoA et entraîne ainsi la cascade de signalisation responsable de la déstabilisation des microtubules (Figure 9) [128].

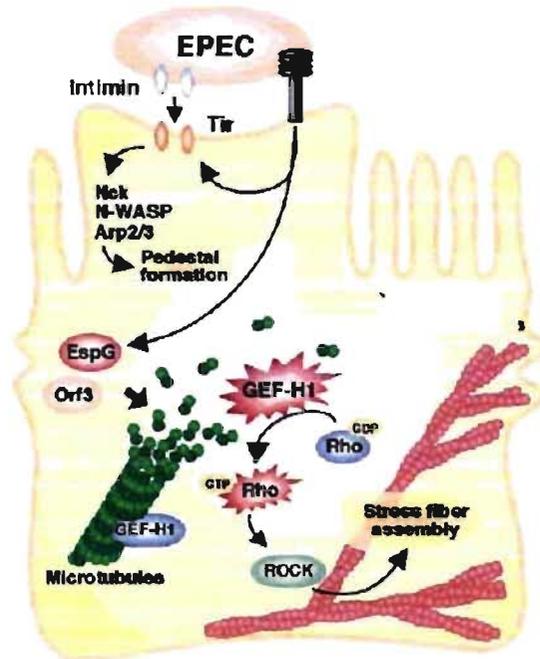


Figure 9: Mode d'action d'EspG et EspG2 dans la cytoplasme de la cellule hôte.

Au cours de ces dernières années, on s'aperçoit qu'EspG et EspG2 jouent un rôle important dans le processus menant à la diarrhée. En effet, ces deux protéines diminuent l'activité d'échange Cl^-/OH^- des cellules épithéliales intestinales [129] et agissent partiellement sur la délocalisation des aquaporines [130]. On ne connaît pas à l'heure actuelle, la raison pour laquelle la bactérie possède deux effecteurs qui semblent agir de façon identique chez l'hôte mais qui sont localisés à des endroits différents.

3.1.2.3.1.3 EspH (Orf18)

Le dernier effecteur qui semble avoir un impact sur le cytosquelette de l'hôte, est EspH. Il est sécrété par le SSTT et codé sur l'opéron LEE3 par le gène *espH* (*orf18*). Il interagit directement ou indirectement avec Cdc42, une petite protéine G de l'hôte faisant partie de la famille Rho [131]. En inactivant Cdc42, EspH diminue la formation de filopode chez la cellule hôte et aide à la formation de piédestal, structure riche en actine.

La surexpression d'EspH provoque l'élongation du piédestal [132]. Le rôle exact d'EspH lors de l'infection n'est toutefois pas encore connu.

Tous les effecteurs cités ci-dessus agissent au niveau de la réorganisation du cytosquelette de l'hôte par effet sur l'actine, ou sur les microtubules. Ceci permet la formation du piédestal et perturbe le mouvement cellulaire. Le rôle exact de cette réorganisation du cytosquelette chez les AEEC n'est pas connu. On suppose qu'elle permet aux bactéries de rester extracellulaires mais on sait que certaines bactéries comme *Shigella*, *Salmonella* qui possèdent le SSTT, modifient le cytosquelette de l'hôte afin de favoriser leur entrée dans la cellule hôte.

3.1.2.3.2 Les effecteurs agissant au niveau mitochondrial et au niveau de la perméabilité de la barrière intestinale

3.1.2.3.2.1 Map

Le gène *map*, anciennement appelé *orf19*, code pour une protéine effectrice appelée Map (Mitochondrial Associated Protein). Map joue trois rôles distincts et indépendants:

- il interfère avec la capacité de la cellule à maintenir le potentiel membranaire mitochondrial augmentant ainsi la sensibilité des cellules hôtes à l'apoptose [133]
- il induit durant les étapes précoces de l'infection, la formation d'extensions comme les filopodes en se liant avec la protéine G de l'hôte Cdc42 (intervention des acides aminés Thréonine Arginine Leucine (TRL) en C-terminal de Map)
- il est essentiel dans l'altération de la barrière intestinale et des jonctions serrées, responsable en partie de la diarrhée [42], [85].

Pour cette dernière fonction, Map aurait comme partenaire une protéine de l'hôte EBP50 (ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding phosphoprotéine), et le facteur de régulation 1 de l'échange Na⁺/H⁺ (NHERF1). EBP50/NHERF1 régule NHE3, un transporteur d'ions nécessaires à l'absorption de sel et d'eau par l'épithélium intestinal. Il est souvent inhibé dans les différents processus menant à la diarrhée, incluant celles causées par les bactéries. L'interaction protéique serait médiée par le motif TRL en C-terminal de Map et le domaine PSD-95/Disk-large/ZO-1 (PDZ1, résidus 14 à 94) de EBP50/NHERF1 (Figure 10). Ainsi le recrutement de EBP50/NHERF1 au site d'attachement des EPEC a lieu grâce à la liaison de son domaine carboxy à la protéine ERM, l'ezrine qui permet de faire le lien entre les

filaments d'actine et la membrane [134], [135]. Le complexe ezrin-EBP50/NHERF1-Map et NHE3 entraîne l'activation de PKA, une protéine kinase dépendante de l'AMPc [136]. PKA une fois activée, phosphoryle et ainsi inhibe NHE3, conduisant ainsi à la perte d'électrolytes et à la diarrhée.

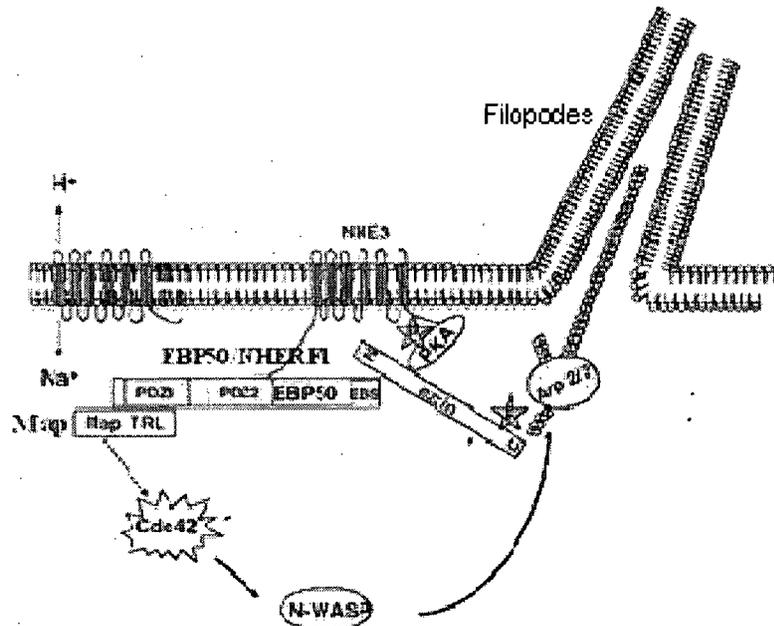


Figure 10: Mode d'action de Map. Adapté de Simpson *et al.* [136].

3.1.2.3.2.2 EspF

EspF est une protéine effectrice riche en proline, codée par le gène *espF*, présent sur l'opéron LEE4 [137]. Une inactivation de ce gène n'affecte pas la formation des lésions A/E [138]. Cependant, plusieurs rôles ont été attribués à cette protéine. L'un des premiers découverts est son action au niveau des mitochondries. Comme Map, EspF entraîne une augmentation de la perméabilité de la membrane mitochondriale de l'hôte. Ceci entraîne un relâchement de cytochrome c dans le cytosol et l'induction de la voie apoptotique mitochondriale, par clivage des caspases 9 et 3 [139], [137], [140]. Il semblerait que cette action d'EspF soit dépendante de la protéine de l'hôte Abcf2, un membre de la famille des ABC transporteurs dont la fonction est encore inconnue [141].

EspF, comme Map, a aussi un rôle dans le processus menant à la diarrhée. Il entraîne la perte de la résistance transépithélium (TER), et donc l'augmentation de la perméabilité cellulaire et la redistribution des protéines associées aux jonctions serrées [63].

EspF peut interagir au niveau du remodelage de la membrane, au niveau du cytosquelette de l'hôte, en agissant sur les filaments d'actine, mais aussi sur les filaments intermédiaires. La structure d'EspF contient six motifs putatifs de liaison aux domaines SH3 et des domaines riches en proline, trois chez les EPEC [138], quatre chez les EHEC [142] et cinq chez *C. rodentium* [143]. Elle peut donc agir avec des protéines intervenant dans la signalisation cellulaire. En effet, EspF forme un complexe avec la protéine cytokeratin 18 et la protéine adaptatrice 14-3-3, présentes dans les filaments intermédiaires, entraînant le réarrangement de ces derniers [144] [64]. Il va également lier la protéine N-WASP et le domaine N-terminal SH3 de la sorting nexin 9 (SNX9), une protéine de l'hôte. SNX9 a un rôle dans le processus d'endocytose et dans le processus menant à la réorganisation de l'actine car elle interagit avec N-WASP [145], [146], [147]. Il a été démontré que la SNX9 est requis pour l'endocytose indépendante de la clathrine mais dépendante de l'actine [148]. Elle permet donc un remodelage de la membrane d'actine, durant l'endocytose. L'activation coordonnée de SNX9 et N-WASP par EspF représente une stratégie du pathogène à mimer le complexe de signalisation de l'hôte SNX9 et N-WASP.

Ces deux protéines EspF et Map sont des effecteurs multifonctionnels qui possèdent des caractéristiques communes. Les mécanismes d'action exacts employés par ces deux protéines restent encore inconnus. Cependant, il existe encore des facteurs de virulence codés par le LEE dont on ne connaît toujours pas le rôle.

3.1.2.3.3 Effecteur à fonction inconnue SepZ (EspZ)

Ce facteur de virulence, sécrété par le SSTT, est très peu conservé parmi les AEEC. Codé par le premier gène de l'opéron LEE2, il présente deux segments transmembranaires conservés, cependant il y a seulement 71,1% d'identité entre SepZ des souches EPEC et SepZ des souches EHEC.

Localisé le long du piédestal près de Tir, son rôle est inconnue mais on sait qu'il n'est pas impliqué dans la formation du piédestal, ni dans la rupture des jonctions serrées ou dans le réarrangement du cytosquelette [149].

Ces facteurs de virulence multifonctionnels, codés par le LEE, nécessitent l'intervention de protéines chaperonnes cytoplasmiques pour être acheminés vers le SSTT sans être dégradés. Plusieurs chaperonnes ont ainsi été découvertes.

3.1.2.4 Les chaperonnes cytoplasmiques

Les protéines chaperonnes du SSTT partagent quelques caractéristiques communes comme un faible poids moléculaire (< à 15 kDa) un point isoélectrique acide et enfin la présence d'hélices α en C-terminal. Elles jouent un rôle stabilisateur et protecteur contre la dégradation. La première chaperonne fut découverte en 1998 et est codée par le gène *cesD*, présent sur l'opéron LEE2. Il s'agit de la protéine CesD, qui est une chaperonne bivalente. Elle est essentiel pour le transport et la stabilité des protéines EspB et EspD (translocateurs), qui forment le pore dans la membrane de la cellule hôte lors de la mise en place du SSTT [150]. Une deuxième chaperonne pour EspD fut identifiée comme la protéine CesD2. Elle est codée par l'*orf27* présent sur l'opéron LEE4 [151]. Ensuite, la protéine CesT (LEE5) de 15 kDa a été, elle aussi, identifiée comme une chaperonne bivalente pour les protéines effectrices Tir et Map (Figure 11) [152], [153]. En 2002 une autre protéine chaperonne pour un effecteur fut découverte. CesF, codée par le gène *cesF* (*rorf10*) présent sur l'opéron LEE3 et qui va interagir spécifiquement avec EspF [154]. La chaperonne CesAB, est bifonctionnelle pour EspA et EspB. Le gène *cesAB* est présent sur l'opéron LEE1 (*orf3*) [155]. Enfin la dernière découverte chez EHEC O157:H7 est L0017 (LEE4), chaperonne d'EspA [156].

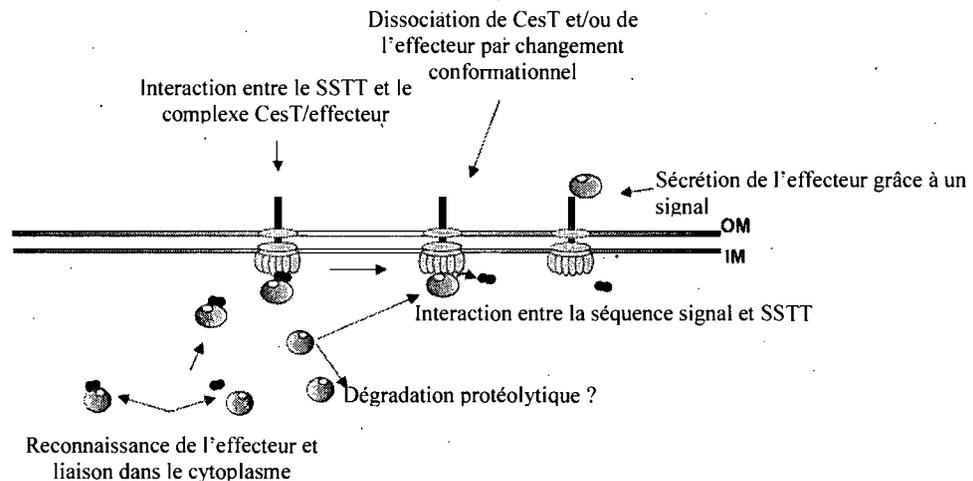


Figure 11: Mode d'action de la chaperonne CesT. CesT reconnaît un effecteur présent dans le cytoplasme; transport jusqu'au SSTT; interaction avec le SSTT via une séquence signale et avec l'ATPase EscN; dissociation de la chaperonne CesT et/ou changement conformationnel de l'effecteur dû peut-être à l'hydrolyse de l'ATPase EscN; puis sécrétion de l'effecteur. Adapté de Thomas *et al.* [157].

La découverte des ces protéines chaperonnes soulèvent quelques questions: pourquoi les protéines EspD, EspB et EspA possèdent-elles deux chaperonnes cytoplasmiques? pourquoi tous les effecteurs ne possèdent-ils pas de chaperonne ? Est-ce parce qu'on ne les a pas encore identifiées? Une étude réalisée en 2005 montre que la protéine chaperonne CesT est importante pour d'autres effecteurs codés en dehors du LEE. Les protéines NleA, NleH, NleF, EspH et EspZ nécessite la présence de CesT pour leur sécrétion [157]. En 2007, il a été démontré que CesT interagissait avec tous ces effecteurs énumérés ci-dessus mais également avec EspG, EspF et NleG [158]. Il semble avoir un rôle dans la hiérarchie de translocation de ces effecteurs. En effet, l'interaction Tir-CesT, suivi de la translocation de Tir est nécessaire avant que les autres effecteurs ne soient pris en charge par CesT et sécrétés par SSTT (Figure 11).

En plus de posséder des effecteurs multifonctionnels, la bactérie utilise des chaperonnes bivalentes ou multivalentes c'est-à-dire qu'elles sont capables de transporter au moins deux protéines.

L'équipe de Kaper a montré, en 1997, que lorsqu'on introduit le LEE_{EPEC} chez la souche *E. coli* K-12 (souche de laboratoire non pathogène), cette souche acquiert la capacité de produire des lésions de type A/E. Ceci indique que le LEE_{EPEC} est nécessaire et surtout suffisant à la production du phénotype A/E [72]. On pensait donc que tous les facteurs de virulence étaient présents sur le LEE. Or, à partir de 2004, on a commencé à découvrir de nouveaux facteurs de virulence importants pour la pathogénicité mais codés en dehors du LEE.

3.2 Les autres déterminants non présents sur le LEE

Depuis quelques années, on a découvert qu'il existait des effecteurs non-LEE qui peuvent être ou non dépendants du SSTT [143] (Tableau II). Il a été constaté que ces effecteurs avaient des localisations diverses et variées: plasmidique, chromosomale ou présent sur d'autres îlots de pathogénicité. Cependant, tous ces supports portent généralement des facteurs de virulence.

Tableau II. Facteurs de virulence présents en dehors du LEE et intervenant dans la pathogénicité des EPEC et/ou des EHEC

| | Protéines | Localisation génétique | Fonction | Localisation | EPEC | EHEC |
|---------------------------------------|-------------|------------------------|--|-------------------------------|-------------|-------------|
| Sécrétion indépendante du SSTT | BFP | Plasmide EAF | Impliquée dans l'adhérence localisée et formation des microcolonies | Membrane externe bactérienne | Oui typique | Non |
| | StcE | Plasmide pO157 | Sérine protéase sécrétée, agit comme une mucinase et un agent pro-inflammatoire | Extracellulaire | certaines | Oui |
| | EspC | Ilot <i>espC</i> | Sérine protéase sécrétée, autotransporteur à activité hémolytique et cytotoxique | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Non |
| | EspP | Plasmide pO157 | Autotransporteur qui intervient dans la colonisation et l'adhérence bactérienne | Extracellulaire | Non | Oui |
| | EhaA | Plasmide pO157 | Autotransporteur qui intervient dans la colonisation et l'adhérence bactérienne et la formation de biofilm | Membrane externe bactérienne | Non | Oui |
| | Efa ou LifA | OI#122 | LifA toxine lymphostatine qui influe l'adhérence et colonisation bactérienne | Membrane externe bactérienne | Oui (LifA) | Oui (Eaf 1) |
| | ToxB | Plasmide pO157 | Toxine lymphostatine qui influe l'adhérence et colonisation bactérienne | Membrane externe bactérienne | Non | Oui |
| Sécrétion dépendante du SSTT | Cif | OI#36 | Formation des fibres de stress et effet cytopathique sur les cellules | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Certaines |
| | EspJ | OI#79 | Inhibe l'opsono-phagocytose | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | Tccp/EspFu | OI#79 | Polymérisation de l'actine, formation des lésions A/E | Cytoplasme de la cellule hôte | Non | Oui |
| | Tccp2 | OI#44 | Polymérisation de l'actine, formation des lésions A/E | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | EspK | OI#50 | Impliquée dans la persistance bactérienne | Cytoplasme de la cellule hôte | Non | Oui |
| | EspM | Diverses | Modulation du cytosquelette d'actine | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |

| | Protéines | Localisation génétique | Fonction | Localisation | EPEC | EHEC |
|-------------------------------------|----------------|------------------------|---|---|------------|------------|
| Sécrétion dépendante du SSTT | EspI/NleA | OI#71 | Inhibe le transport des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | NleC, NleD | OI#36 | Inconnue | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | NleH1 et NleH2 | OI#71 et OI#36 | Inconnue | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | NleB | OI#122 | Rôle dans la colonisation | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | NleF | OI#71 | Rôle dans la colonisation | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | NleE | OI#122 | Recrute les polymorphonucléaires | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Oui |
| | NleI/NleG | diverses | Inconnue | Cytoplasme et membrane de la cellule hôte | Oui (NleI) | Oui (NleG) |
| | EspG2 | Ilot <i>espC</i> | Rupture du cytosquelette | Cytoplasme de la cellule hôte | Oui | Non |

3.2.1 Facteurs de virulence indépendants du SSTT

Plusieurs facteurs indépendants du SSTT interviennent dans la pathogénicité des AEEC mais nous ne présenterons ici que les plus importants et les plus étudiés.

3.2.1.1 BFP

Parmi les pathogènes formant les lésions A/E, seules les EPEC typiques possèdent BFP, un pili de type IV. Les 14 gènes codant ce pili sont présents sur l'opéron *bfp* de 11,5 kb et furent décrits pour la première fois en 1991 [159]. Cet opéron est localisé sur le plasmide EAF, présent seulement chez les EPEC typiques. Son expression est régulée par la température et la présence d'ions calcium et ammonium. Le pili BFP peut faire de 50 à 500 nm de large et 14 à 20 μm de long (Figure 12).

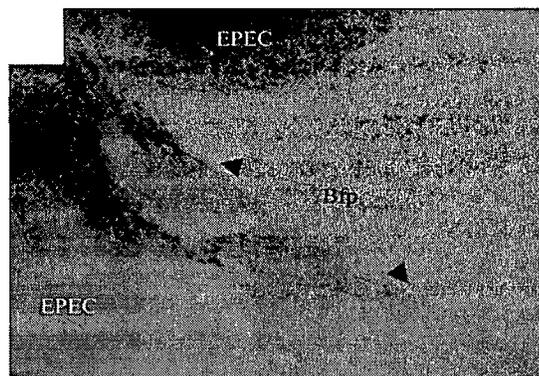


Figure 12: Observation en microscopie électronique du pili BFP présent à la surface des EPEC [160].

Sa structure montre la présence d'un complexe qui s'étend de la membrane interne bactérienne jusqu'au milieu extracellulaire (filament BfpA). BfpF est impliqué dans le mécanisme qui entraîne la rétraction du pili, tandis que BfpD permet quant à lui son extension [161]. La composante majeure du pili est la protéine BfpA (bundline), dont il existe différents types. BFP est impliqué dans l'étape d'attachement initial non-intime dans la formation des lésions A/E comme mentionné plus haut. Il a deux rôles distincts dans le phénomène d'adhérence localisée, il est impliqué dans la formation des microcolonies (autoagrégation) [162] et dans l'étape d'adhérence initiale aux cellules hôtes, grâce à la

protéine BfpA [163]. La formation des microcolonies est un mécanisme physique indépendant des différents types de bunduline et correspond à une interaction bactérie-bactérie. Cette agrégation des bactéries, due à BFP, a également son rôle durant la formation des biofilms [99]. Toutefois, le phénomène de liaison aux cellules hôtes est propre à la bunduline α , une adhésine spécifique de LacNAc (N-acétyllactosamine glycoside) qui se lie au LacNAc ou un récepteur contenant LacNAc, comme la phosphatidyléthanolamine, sur la surface des cellules hôtes [164], [165]. D'autres facteurs sont aussi impliqués dans l'adhésion avec les cellules, comme EspA, l'intimine et LifA qui seront détaillés plus tard.

3.2.1.2 StcE

Découvert en 2002 chez la souche EHEC O157:H7 EDL933, le gène *stcE* (secreted protease of C1 esterase inhibitor from EHEC) est présent sur le plasmide pO157. Certaines souches EPEC atypiques possèdent ce gène [166]. L'activité de StcE est dépendante de la présence du zinc et elle est sécrétée par le système de sécrétion de type II *etp*, codé par le plasmide pO157 chez les EHEC. Cette protéine, indépendante du SSTT, est cependant régulée positivement par le régulateur principal du LEE, Ler. Elle doit donc avoir un rôle important à une étape de l'infection. De plus, cette protéine extracellulaire est résistante à de nombreuses protéases de l'hôte [167].

StcE a deux rôles durant l'infection, il agit d'abord comme une mucinase et ensuite comme un agent pro-inflammatoire. StcE est capable de cliver la mucine 7 et la glycoprotéine 340, deux glycoprotéines présentes dans la salive ayant un rôle important dans le mécanisme de défense orale innée. Cette activité mucinase de StcE contribue à l'efficacité d'une dose infectieuse faible de EHEC O157:H7, en prévenant la formation d'agrégats bactéries-mucines qui mènerait à l'élimination des bactéries dans des environnements mucosaux comme la cavité orale. Elle permet donc le passage des bactéries à travers la cavité orale. Dans le colon, StcE clive les glycoprotéines qui protègent la surface épithéliale intestinale, réduisant ainsi la compétition avec d'autres bactéries et permettant un rapprochement avec la membrane de la cellule hôte [168]. Une fois que la bactérie a injecté les différents facteurs de virulence compromettant la barrière endothéliale et épithéliale, StcE va cliver l'inhibiteur estérase C1 (C1-INH), une protéine de l'hôte membre de la famille des inhibiteurs des protéases de sérine. Le clivage de C1-INH

entraîne l'activation de la cascade du complément résultant à des dommages tissulaires, à la coagulation pro-thrombique menant au développement du SHU [166].

3.2.1.3 Les autotransporteurs

3.2.1.3.1 EspC

Découvert en 1996, le gène *espC* est présent sur le second îlot de pathogénicité des EPEC, l'îlot *espC*. La protéine EspC n'intervient pas dans l'adhérence et l'invasion de la cellule hôte [169]. Elle est classée dans la famille des autotransporteurs puisqu'elle contient trois domaines classiques: une séquence signal Sec-dépendant, un domaine passager et un domaine servant à sa propre translocation à travers la membrane externe. Par son motif serine-protéase, elle fait partie de la sous famille des SPATE, famille d'autotransporteurs sérine-protéases des *enterobacteriaceae*. La sécrétion d'EspC est régulée par le milieu de culture et est dépendante du contact avec l'hôte. De plus, l'expression d'EspC est régulée par Ler, régulateur principal du LEE. EspC a donc un rôle dans la pathogénicité.

EspC possède une activité cytotoxique et une activité entérotoxique [170]. Pour son activité cytotoxique, EspC est internalisé par le phénomène de pinocytose, indépendamment de la présence d'un récepteur. L'internalisation d'EspC par les cellules Hep-2 est spécifique au lieu d'attachement de la bactérie et se produit 30 minutes après l'infection, soit en même temps que la formation du piédestal. Une fois la formation du piédestal terminée, EspC se retrouve partout dans le cytosol de l'hôte. Il se lie et clive alors la fodrine, protéine de l'hôte, entraînant ainsi des dommages au niveau du cytosquelette [171]. EspC est également une toxine hémolytique. La dégradation de l'hémoglobine humaine par EspC permet aux bactéries d'utiliser l'hème et le fer pour leur croissance [172].

3.2.1.3.2 EspP

Tout comme EspC, EspP est un autotransporteur faisant partie de la famille des SPATE. Présent seulement chez les EHEC O157:H7, il est localisé sur le plasmide pO157. Il existe quatre types d'EspP [173]. Sécrété dans le milieu extracellulaire, il intervient dans la colonisation intestinale chez les bovins et l'adhérence bactérienne en culture cellulaire

[174]. Il clive également le facteur de coagulation V humain [175]. Cependant, on ne connaît pas le rôle exact de cet autotransporteur.

EspP est identique à 99% avec PssA (Protein secreted by Shiga toxine producing *E. coli*). Malgré cette forte homologie, PssA et EspP n'ont pas la même fonction. PssA possède une activité cytopathique sur les cellules Vero, ce qui n'est pas le cas d'EspP [176], [177].

3.2.1.3.3 EhaA

Une étude récente décrivant de nouveaux autotransporteurs dont Eha, indique que le gène *ehaA* se retrouve sur le plasmide pO157 des EHEC O157:H tout comme *espP*. EhaA est associé à la surface bactérienne et est capable d'interagir avec lui-même. Il contribue à l'adhésion et la colonisation bactérienne et la formation de biofilm [178].

3.2.1.4 LifA/Eaf1 et ToxB

Le gène chromosomique *lifA* chez les EPEC code une toxine lymphostatine qui inhibe la prolifération des lymphocytes et des cellules mononucléaires de la lamina propria [179]. Elle inhibe également la synthèse de cytokines pro-inflammatoire comme IL-2, IL-4 et IL-5 et aurait potentiellement un rôle dans l'adhérence en absence de BFP [180]. Elle a été découverte par l'analyse de mutants *TnphoA* qui montraient une réduction dans l'adhésion aux cellules épithéliales [181]. Elle peut ainsi faciliter la colonisation en supprimant l'activation des lymphocytes et cytokines et en agissant comme adhésine.

Chez les EHEC LEE+ non O157, un gène *efal* (*E. coli* factor for adherence), dont la séquence nucléotidique est à 97,4% identique à celle du gène *lifA*, a été découvert [181]. La protéine Eaf1 influe, tout comme LifA, l'adhérence bactérienne en culture de cellules épithéliales et la colonisation intestinale chez la vache [182], [180].

Chez les EHEC O157:H7, *efal* existe sous forme tronquée mais est quand même fonctionnelle dans l'ilot OI#122 de EDL933 et a le même rôle que Efa1 [183]. La protéine Eaf1/LifA partage 47% de similarité en acides aminés avec ToxB, dont le gène est retrouvé sur le plasmide de virulence pO157 des EHEC [179, 181]. ToxB semble moduler la synthèse et la sécrétion de certaines protéines du SSTT du LEE impliquées dans

l'adhérence aux cellules épithéliales et la formation des lésions A/E *in vitro* [183]. Le gène ToxB serait un homologue fonctionnel de la lymphostatine LifA [179].

3.2.2 Les facteurs de virulence dépendants du SSTT

Il existe également des facteurs de virulence qui sont sécrétés via le SSTT mais qui sont codés sur d'autres îlots de pathogénicité que le LEE.

3.2.2.1 Cif

Cif (Cycle-inhibiting factor) fut le premier effecteur non-LEE identifié et transloqué via le SSTT. Son domaine N-terminal est requis pour sa sécrétion et sa translocation, tandis que son domaine C-terminal a un rôle dans la stabilité et le repliement de la protéine [184]. Le gène *cif* est présent sur un phage lambdaïde aussi bien chez les EHEC (OI#36) que les EPEC. Il n'est pas fonctionnel chez toutes ces souches. Il est notamment absent chez la souche EHEC O157:H7 Sakai.

Cif est impliqué dans la formation des fibres de stress et donc dans la réorganisation du cytosquelette de façon Rho-dépendante. Il entraîne également un effet cytopathique irréversible sur les cellules. Il fait partie de la famille des cyclomodulines, c'est-à-dire des effecteurs qui modulent le cycle cellulaire de l'hôte. Il inhibe l'entrée des cellules en phase M (mitose), ce qui entraîne une accumulation des cellules en phase G2. Au cours du cycle cellulaire, la transition de la phase G2 en phase M, se déroule grâce à la déphosphorylation de Cdk1 (cyclin-dependent kinase 1) par Cdc25. La voie par lequel Cif entraîne une inhibition du cycle cellulaire n'est pas encore connue, mais on sait qu'elle empêche la déphosphorylation de Cdk1 [185]. Cette influence sur le processus de renouvellement et de développement cellulaire faciliterait la colonisation bactérienne en augmentant le nombre de cellules permissives pour l'attachement. Cif pourrait aussi cibler les cellules T qui sont cruciales pour l'initiation et la régulation de la réponse immunitaire mucoale innée et adaptative. Aucun autre facteur ne semble être impliqué dans ce phénomène [186].

3.2.2.2 Les autres Esp

Comme mentionné plus haut, les protéines EspA, B et D sont des composants du SSTT, mais d'autres protéines Esp ont été récemment identifiées comme étant des protéines effectrices du SSTT.

3.2.2.2.1 EspJ

Présent chez les EPEC, les EHEC et *C. rodentium*, EspJ est sécrété par le SSTT mais il n'est pas requis pour la formation des lésions A/E *in vitro* et *ex vivo* (modèle IVOC). Chez les EHEC, le gène *espJ* est organisé en opéron avec un autre facteur de virulence EspFu et est présent sur l'îlot OI#79 (CP-933U) [187]. L'expression de cet opéron est Ler-indépendante. Elle est toutefois affectée par la composition du milieu et les conditions environnementales, telles que la température, le pH, l'osmolarité et la pression en dioxygène *in vitro*. Les premières expériences réalisées avec EspJ montre que cette protéine semble avoir des propriétés anti-virulentes chez *C. rodentium*. [188]. En 2008 cependant, on a découvert qu'EspJ des EHEC et des EPEC était responsable de l'inhibition de l'opsono-phagocytose médiée par les récepteurs CR3 (complement receptor 3) et FcγR (Fc gamma receptor) présents sur les macrophages. En temps normal, les fragments C3bi et IgG se lient à la bactérie et, suite à cette interaction, il y a reconnaissance de ces fragments par les récepteurs CR3 et FcγR, respectivement. La bactérie sera ensuite opsonisée. EspJ, par un mécanisme encore inconnu, inhibe cette opsono-phagocytose médiée par CR3 et FcγR [189].

3.2.2.2.2 EspFu ou Tccp (Tir cytoskeleton coupling protein)

En 2004, deux études indépendantes ont montré l'existence d'un facteur de virulence EspFu ou Tccp (Tir cytoskeleton coupling protein) qui intervient dans la polymérisation de l'actine via Tir. Découvert chez 100% des EHEC O157:H7, il est localisée sur l'îlot OI#79 (CP-933U). Tccp est également présent chez les non-O157:H7 et chez quelques EPEC typiques et atypiques [190]. Il est identique à 35% à la protéine EspF présente sur le LEE. EspFu, comme EspF, permet la rupture des jonctions serrées [142].

Cette protéine, dépendante du SSTT, possède six motifs identiques riches en proline en C-terminal [190], [191]. La région C-terminale lui permet de mimer l'activité de la

protéine de l'hôte Cdc42 ou Nck en liant le domaine GBD (GTPase Binding Domain) de N-WASP, une protéine de l'hôte responsable du réarrangement du cytosquelette [123]. Il suffit seulement de deux motifs de prolines répétés pour générer les liaisons A/E [190]. Suite à cette liaison EspFu/N-WASP, il y a recrutement et activation de N-WASP vers le récepteur bactérien Tir. EspFu agit donc comme un intermédiaire via son domaine C terminal riche en proline entre Tir et le domaine de liaison GTPase de N-WASP durant la formation du piédestal. Cependant ni EspFu, ni N-WASP ne semblent interagir directement avec Tir_{EHEC}. Par son domaine SH3, la cortactine (paragraphe 2.1.2.3), protéine de l'hôte, peut interagir avec la partie N-terminale de Tir et d'EspFu (Figure 13). Cependant, la partie N-terminale de Tir n'est pas requise pour la formation du piédestal [192], [124]. On ne connaît donc pas encore la manière dont EspFu intervient mais on sait qu'il est responsable en partie du réarrangement de l'actine.

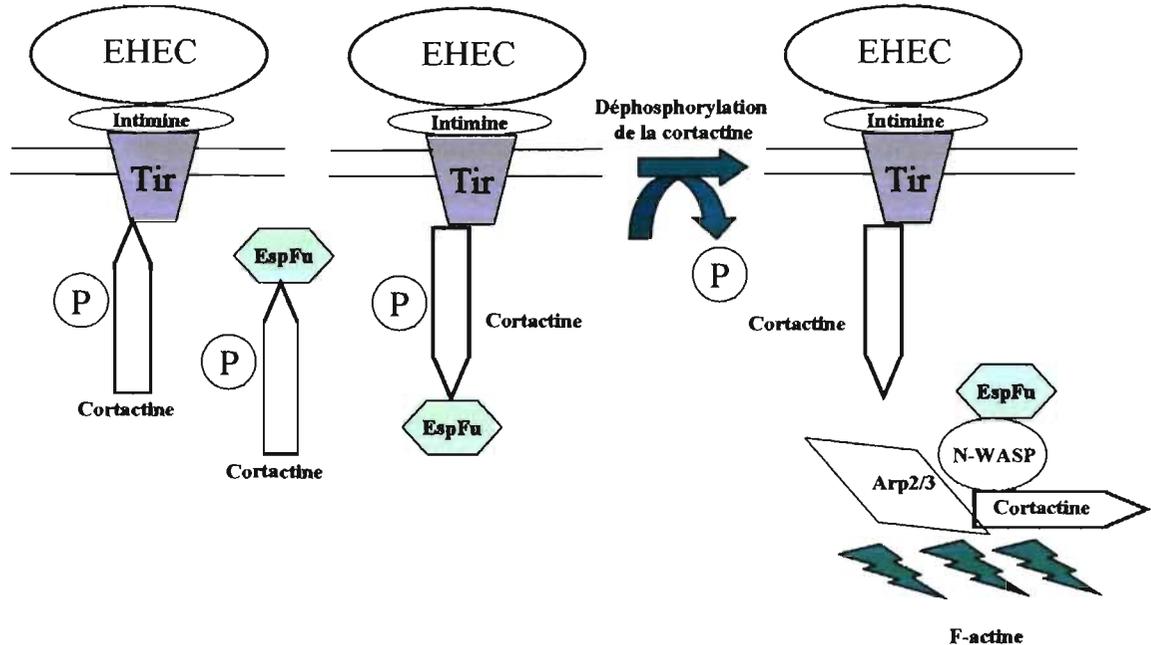


Figure 13: Mode d'action d'EspFu. Adapté de Cantarelli et al. [192].

EspFu semble également stabiliser l'association bactérienne avec le cytosquelette des cellules épithéliales intestinales et ainsi promouvoir l'expansion de l'infection [193].

Chez EHEC O157:H7, un pseudogène *tccp*, renommé *tccp2* est présent sur l'îlot OI#44 (CP-933M). Cette protéine Tccp2 (ou EspF_M), comme Tccp, est sécrétée via le SSTT. Une étude a montré que Tccp2 est fonctionnellement interchangeable avec Tccp [194]. Tccp2 est également présent chez les non-O157:H7 et chez certaines EPEC [195].

3.2.2.2.3 EspK

Le gène *espK* est présent sur l'îlot OI#50 (CP-933N) chez les EHEC O157:H7 EDL933. Un homologue de ce gène fut uniquement découvert chez *C. rodentium* (*orf45*). La protéine EspK est sécrétée par le SSTT et présente en N-terminal un domaine répété riche en leucine (LRR). Une mutation dans le gène chez les EHEC n'affecte ni l'adhérence ni la nucléation de l'actine durant l'infection des cellules HeLa. EspK est cependant nécessaire à la persistance des bactéries EHEC dans les intestins de vaches, l'hôte primaire. Par contre, une mutation de l'orthologue d'*espK* chez *C. rodentium* n'affecte pas la colonisation chez les souris. On ne connaît donc pas encore le rôle exact de ce nouveau facteur dépendant du SSTT [196].

3.2.2.2.4 EspM

Découvert en 2008, grâce à son motif WxxxE conservé, EspM est présent chez les EPEC (EspM1 et TrcA), chez les EHEC (EspM1 et EspM2) et chez *C. rodentium*, (EspM2 et EspM3). Par le motif WxxxE, elles font partie comme Map de la famille d'effecteurs modulant le cytosquelette d'actine en ciblant les Rho GTPases de l'hôte. Il existe 22 Rho GTPases chez l'homme qui régulent de nombreux processus cellulaires comme la polymérisation de l'actine, la dynamique des microtubules, le cycle cellulaire, la morphogénèse et la migration. Une fois sécrétée via le SSTT, EspM induit la formation des fibres de stress. L'action d'EspM2 et 3 est dépendante plus précisément de la voie RhoA-ROCK-LIMK-colifine [197]. Toutefois, le mécanisme utilisé par EspM reste encore à déterminer.

3.2.2.3 La famille des effecteurs non-LEE (Nle)

3.2.2.3.1 NleA (EspI)

NleA (Non LEE effector A) fut le premier effecteur non-LEE identifié, qui est transloqué via le SSTT. Le gène *nleA* est présent chez les EPEC, chez *C. rodentium* et chez les EHEC sur l'îlot OI#71 prophage (CP-933P) [198]. À l'heure actuelle, il existe 15 variants de *nleA*. Certaines souches possèdent deux copies du gène mais une des copies est interrompue par l'élément d'insertion ISEc8 de 651 bp [199].

NleA semble jouer un rôle clé dans la virulence de *C. rodentium* lors de l'infection chez les souris. Elle possède un ou deux domaines transmembranaires et se retrouve associée à l'appareil de Golgi. Cependant, elle ne possède aucun motif connu ciblant l'appareil de Golgi et ne semble pas nécessiter la présence d'autres facteurs de virulence pour sa localisation. L'appareil de Golgi est le site de modifications post-traductionnelles des protéines, comme la glycosylation, et a aussi un rôle dans la trafic des protéines dont la sécrétion. NleA interagit directement avec Sec24 et compromet le complexe Sec23/24, un composant de la vésicule de transport COPII. Ces vésicules ainsi inhibées n'assurent plus le transport des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi. On ne connaît pas encore la conséquence de cette interaction sur la pathogénicité [200].

La dernière étude réalisée avec NleA montre que cette protéine est capable d'interagir avec 15 protéines de l'hôte, dont certaines contiennent un motif PDZ. NleA possède en C-terminal un site de liaison au motif PDZ et ce dernier semble être important pour la localisation de NleA au niveau de l'appareil de Golgi. Les protéines de l'hôte possédant ce motif PDZ sont généralement impliquées dans des complexes de signalisation. Parmi les partenaires de NleA, certaines représentent de nouvelles cibles jamais identifiées auparavant. Par exemple, la syntrophine est une protéine adaptatrice modulaire importante pour le maintien de l'intégrité de la membrane. NleA interagit également avec des protéines importantes dans la formation des jonctions serrées, et le processus d'endocytose. Le seul autre facteur de virulence capable de lier des protéines de l'hôte connu à ce jour possédant le domaine PDZ est Map [201].

3.2.2.3.2 NleC et NleD

Les gènes *nleC* et *nleD* sont présents chez les EPEC, chez les EHEC sur l'îlot OI#36 (prophage CP-933K) et chez *C. rodentium*. Sécrétées via le SSTT dans la cellule hôte, les protéines NleC et NleD doivent avoir un rôle dans l'interaction hôte-pathogène mais il n'a pas encore été découvert. Des infections *in vitro* et *ex vivo* montrent que ni NleC, ni NleD ne jouent un rôle dans la formation des lésions A/E, dans l'adhérence en culture cellulaire et en modèle IVOC (*in vitro* Organ Culture). Cependant, ces deux protéines partagent des caractéristiques communes, comme la présence d'un domaine qui lie le zinc. Ceci suggère qu'elles auraient une activité métallopeptidase [202].

3.2.2.3.3 NleH1 et NleH2

Découvert en premier lieu chez *C. rodentium*, *nleH* est également présent chez les EHEC et les EPEC. Cependant, il existe deux NleH chez les AEEC, NleH1 et NleH2, qui sont localisés sur des îlots de pathogénicité différents, l'îlot OI#71 et l'îlot OI#36 respectivement chez EHEC O157:H7 EDL933. Ils sont sécrétés par le SSTT grâce à leurs 19 acides aminés en N-terminal et se retrouvent associés à la membrane de l'hôte. La présence de la chaperonne CesT est nécessaire à leur stabilité et leur sécrétion puisqu'en son absence, elles vont être dégradées par la protéase Lon. NleH1 et NleH2 sont régulés au niveau post-transcriptionnel par un mécanisme encore indéterminé mais qui fait intervenir Ler et GrlA (paragraphe 4.1), deux régulateurs du LEE. La présence d'un autre facteur encore inconnu mais régulé par Ler est impliqué dans la stabilité de NleH. Le rôle de NleH1 et NleH2 reste encore à déterminer, cependant on sait qu'une mutation de ce gène n'affecte pas la formation du piédestal chez les cellules épithéliales [203].

La présence de deux homologues sur des îlots différents chez les AEEC n'est pas si surprenante, puisqu'on retrouve aussi la présence d'EspG et EspG2, des homologues présents sur des îlots différents.

3.2.2.3.4 NleB

Identifié chez *C. rodentium*, le gène *nleB* est présent sur l'îlot OI#122 chez les EHEC O157:H7 EDL933, mais est également présent chez les EPEC. Ces protéines sécrétées par le SSTT ont un rôle dans la colonisation par *C. rodentium* chez la souris. Son rôle exact reste encore à déterminer [204].

3.2.2.3.5 NleF

Le gène *nleF* est présent sur l'îlot OI#71 chez les EHEC O157:H7 EDL933, mais est également retrouvé chez les EPEC et chez *C. rodentium*. La protéine, dépendante du SSTT, possède plusieurs régions comprenant des hélices α et est localisée dans le cytoplasme de l'hôte. Elle ne contribue ni à l'adhérence bactérienne ni à la formation du piédestal mais joue un rôle modeste dans la colonisation chez les souris infectées par *C. rodentium* et chez les porcelets infectés avec EHEC O157:H7. Son rôle n'a pas encore été défini mais elle peut agir de concert avec d'autres facteurs de virulence [205].

3.2.2.3.6 NleE

Tout comme *nleB*, le gène *nleE* est retrouvé chez les EPEC, chez *C. rodentium* et aussi chez les EHEC sur l'îlot OI#122. Sécrété par le SSTT, NleE est nécessaire à la virulence de *C. rodentium* lors de l'infection chez les souris [206]. C'est le seul effecteur connu à ce jour qui assure le recrutement des polymorphonucléaires (PMN) de la sous-muqueuse vers le lumen intestinal. Il se retrouve associé au nucléole de la cellule hôte grâce à sa région C-terminale. Il peut directement interagir avec une protéine de l'hôte possédant un signal de localisation nucléaire ou avec une autre protéine bactérienne nucléaire pour permettre son entrée dans le noyau de l'hôte et l'activation de facteurs permettant le recrutement des PMN. Le mécanisme employé par NleE est encore inconnu. Cependant, l'activation de la migration des PMN et d'autres processus inflammatoires contribuent à la pathogenèse, bien qu'une activation trop importante de la réponse inflammatoire peut activer le système immunitaire de l'hôte et entraîner la mort bactérienne. On sait que les EPEC, par l'intermédiaire entre autres de NleE, influencent l'induction de la réponse inflammatoire [207].

3.2.2.3.7 NleI/NleG

Le gène *nleI* est associé à l'îlot où *nleBCD* sont présents chez les EPEC. La sécrétion de NleI est dépendante du SSTT et de la chaperonne CesT. Sa fonction n'a pas encore été élucidée, mais on sait que NleI n'est pas impliqué dans la formation du piédestal et qu'il est localisé dans le cytoplasme et la membrane de l'hôte [208].

Des homologues ont été retrouvés chez d'autres AEEC et nommés NleG. Chez EHEC O157:H7 Sakai, on compte 14 copies de *nleG* localisées à différents endroits (Sp10-11-12) et 13 membres retrouvés chez la souche EPEC lapine E22 [209].

D'une façon générale, les effecteurs du SSTT ciblent des compartiments cellulaires différents et affectent diverses voies de signalisations et processus physiologiques cellulaires. En se basant sur des mutants *sepL*, *sepD* (cf paragraphe 4.1.4) favorisant la sécrétion, sur des études de bioinformatique, des îlots de pathogénicité et des domaines de conservation des protéines, un grand nombre de facteurs de virulence ont été découverts et sont continuellement découverts. En effet, en 2004 une équipe a identifié une vingtaine de

protéines grâce aux mutants *sepL* et *sepD* [143]. En 2006, une analyse *in silico* effectuée sur le génome de la souche EHEC O157:H7 Sakai a identifié 39 protéines, réparties en 20 familles. Certaines de ces protéines ont été confirmées comme étant sécrétées via le SSTT en utilisant un mutant *pch* hypersécréteurs ainsi que des tests de fonctionnalité. Beaucoup de facteurs devront encore être identifiés par la suite.

Il existe donc de nombreux facteurs de virulence codés ou non par le LEE et sécrétés par le SSTT. Chacun de ces facteurs a des rôles multiples et variés, montrant ainsi la complexité de l'infection. L'utilisation de facteurs polyfonctionnels par la bactérie indique une certaine capacité d'adaptation aux conditions du milieu. L'efficacité de la pathogenèse pourrait s'expliquer entre autres par le fait que ces effecteurs LEE et non-LEE ont la capacité de coopérer pour altérer les processus cellulaires de l'hôte. [42]. Il existe donc une interaction fonctionnelle entre plusieurs îlots de pathogénicité au sein même des AEEC. Cette capacité d'interaction se fait grâce à une régulation précise et complexe de ces différents facteurs de virulence, comme nous allons le voir dans la prochaine section.

4 Les systèmes de régulation connus à ce jour chez les pathogènes attachants et effaçants

Au cours des dix dernières années, les connaissances sur la régulation de ces facteurs de virulence LEE et non-LEE se sont considérablement améliorées. Ceci nous a permis, en partie, de comprendre la façon dont les EPEC et EHEC perçoivent et répondent à l'hôte et aux différents stimuli environnementaux. Il est important de souligner que ces deux pathotypes présentent des similarités mais aussi des différences dans les mécanismes de régulation.

Il existe des régulateurs qui agissent seulement au niveau des facteurs de virulence (régulateurs spécifiques) et d'autres qui sont non-spécifiques à ces facteurs (régulateurs globaux) (Tableau III et Figure 14).

Tableau III: Tableau comparatif des différentes protéines régulatrices intervenant chez les EPEC et/ou les EHEC. √: présent chez le pathotype; /: absent chez le pathotype; ?: encore inconnu; +: action positive sur la régulation du gène; -: action négative sur la régulation du gène.

| Type de régulateurs | Protéines régulatrices | EPEC | EHEC | Références |
|-------------------------|------------------------|---|---|--|
| | Ler | √ LEE2,3,4, 5 et <i>espC</i> (+) | √ LEE2,3,5, <i>grlRA</i> et <i>stcE</i> (+) | [204] [205], [206], [207], [137, 208, 209] |
| | PerA, PerC | √ (typiques) PerC: <i>ler</i> (+) PerA: <i>bfpA</i> (+) | / | [210] [211] [212] |
| | PchA, B, C | / | √ LEE1, <i>espA,B,D</i> (+) | [213] |
| Régulateurs spécifiques | GrlA | √ LEE1 et <i>per</i> (+) <i>flhd</i> (-) | √ <i>ler</i> (+) <i>flhd</i> (-) | [214] [215] [216] |
| | GrlR | √ GrlA (-) | √ GrlA (-) | [215] [216] |
| | SepL | √ EspA, EspB, EspD (+) | √ EspA, EspB, EspD (+) | [217] |
| | SepD | √ Protéines composants le SSTT et les effecteurs (+) | √ Protéines composants le SSTT et les effecteurs (+) | [217] |

| Type de régulateurs | Protéines régulatrices | EPEC | EHEC | Références |
|---------------------|------------------------|--|--|-------------------|
| Régulateurs globaux | H-NS | √ LEE1,2,3,4, 5 (-) | √ LEE1,2,3,4, 5 (-) <i>flhD, fliA</i> (+) | [218] [205] [219] |
| | GadX | √ Basidité: <i>perA</i> (+) Acidité: <i>perA</i> (-) | √ Basidité: <i>perA</i> (+) Acidité: <i>perA</i> (-) | [220] |
| | QseEF | ? ? | √ <i>espFu</i> (+) | [221] |
| | QseA | √ <i>ler, per, grlRA</i> (+) <i>flhDC</i> (-) | √ <i>ler, grlRA</i> (+) | [222] [216] [223] |
| | QseBC | ? ? | √ <i>flhDC</i> (+) | [236] |

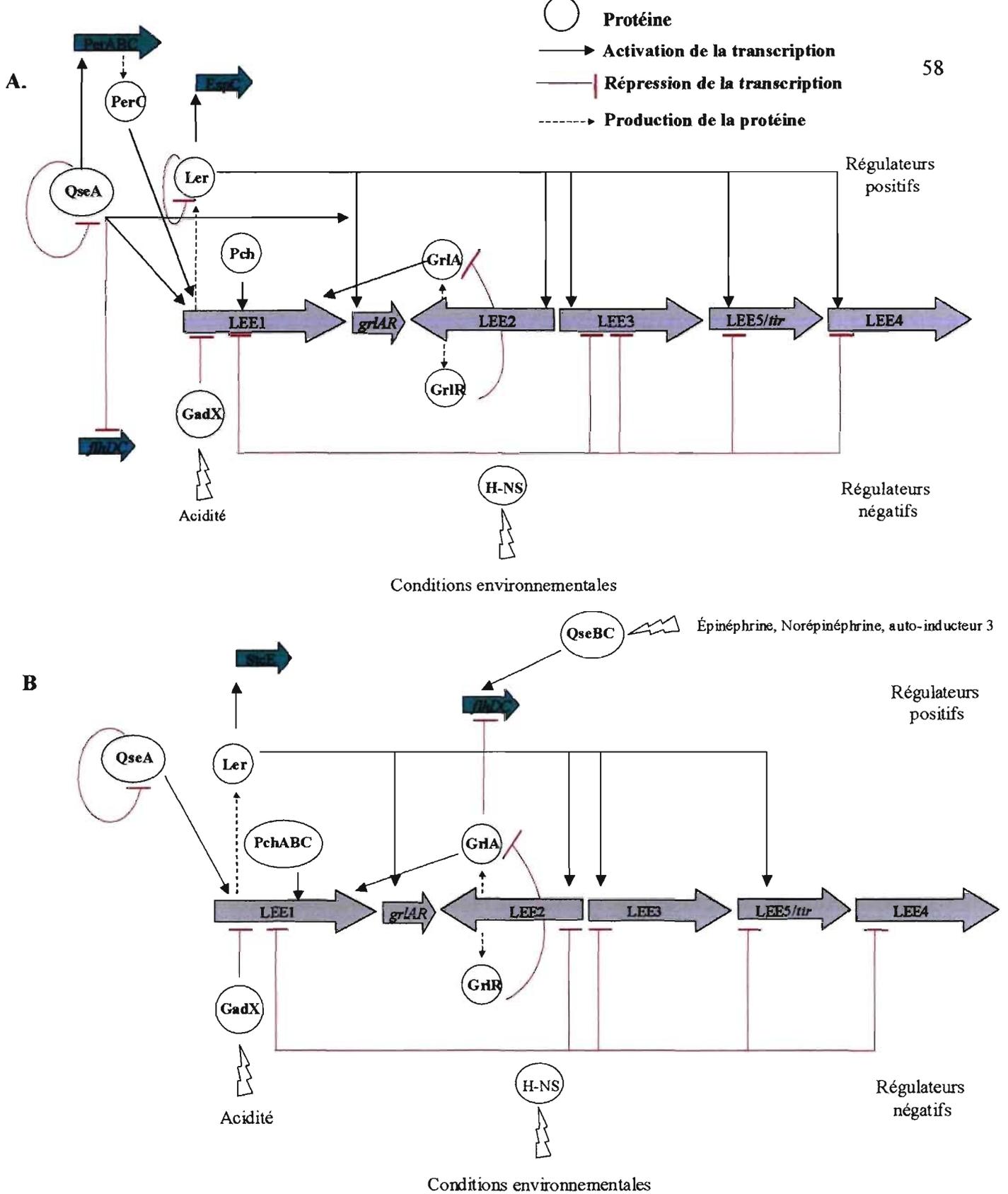


Figure 14: Mode de régulation du LEE chez les EPEC (A) et chez les EHEC (B). Les flèches grises représentent les différents opérons du LEE. Les flèches vertes représentent les gènes codant les autres facteurs de virulence.

4.1 Les régulateurs spécifiques

On entend par régulateurs spécifiques ceux qui agissent uniquement sur le LEE et/ou sur les autres facteurs de virulence non-LEE ayant un rôle dans la pathogénicité. Ils peuvent ainsi permettre une coopération des différents facteurs de virulence localisés sur différents îlots.

4.1.1 Ler

Le régulateur principal dans la pathogénicité des AEEC est codé par le gène *ler*, premier gène présent sur l'opéron LEE1. Ce régulateur montre des caractéristiques similaires à ceux de la famille des protéines ressemblant aux histones, comme H-NS (Histone-like Nucleoid Structuring) régulateur global répondant à divers stimuli environnementaux. En effet, chez les EPEC, Ler augmente la transcription des opérons LEE2, LEE3, LEE4 et LEE5 [210], [211], [212], [213], et également celle d'*espC* [214]. Chez les EHEC, il régule l'activité transcriptionnelle des opérons LEE2, LEE3 et LEE5 [210] et celle d'un autotransporteur StcE présent sur le plasmide pO157 [212]. Chez les EHEC O157:H7, les gènes codant le LPF sont aussi régulés positivement par Ler [210]. Chez les EPEC comme les EHEC, Ler intervient dans les étapes précoces de l'infection et permet une expression simultanée des différents facteurs de virulence (Figure 13) [215]. Son mode d'action est de lier la région en amont des promoteurs des opérons comme H-NS. Ler agit en déstabilisant la liaison H-NS avec l'ADN et prend ainsi sa place. Ler n'est toutefois pas un antagoniste général de H-NS [210].

Une étude a démontré que Ler s'autoréprime lorsqu'il est présent en grande quantité chez les EPEC [216]. Une analyse transcriptionnelle chez une souche EHEC a mis en évidence que Ler activait environ 1 300 gènes mais n'en réprimait aucun [34]. Il semblerait donc que la régulation de Ler diffère entre les EHEC et les EPEC.

Ler est le régulateur le plus important des souches AEEC car il est le seul à agir sur autant de facteurs de virulence LEE et non-LEE à la fois. De plus, il est lui même soumis à l'action de plusieurs autres régulateurs.

4.1.2 Le locus *perABC/pchABC*

Le locus *perABC* (plasmid-encoded-regulator ou *bfpPVW*) est présent sur le plasmide EAF des souches EPEC typiques. Il est composé des gènes *perA*, *perB* et *perC* [217]. PerA, membre de la famille des activateurs transcriptionnels AraC, permet la régulation transcriptionnelle directe de l'opéron *bfp* [218]. Il est également sujet à sa propre régulation. PerB montre des homologies avec des protéines liant l'ADN eucaryote. PerC, qui ne présente aucune homologie de séquence avec d'autres protéines connues, active la transcription de *ler* [219].

Le plasmide EAF étant absent chez les EHEC, des homologues de *perABC* ont été recherchés. Seuls des homologues de PerC ont été identifiés chez EHEC O157:H7 et nommés *pchA* (PerC homologue), *pchB* et *pchC* (CP-933R). Ils permettent l'activation de la transcription du LEE1, d'*espA*, *espB*, *espD* et jouent un rôle dans l'adhérence au cellules Hep-2 [220].

4.1.3 GrlA (global regulator of LEE activator) et GrlR (repressor)

Les gènes *grlA* et *grlR* sont présents entre les opérons LEE1 et LEE2 chez les EHEC et les EPEC et sont eux-mêmes organisés en opéron. Ils permettent une régulation coordonnée de l'expression des gènes du LEE et des gènes codant pour les flagelles [221]. En effet, chez EHEC O157:H7, GrlA active la transcription de *ler* en se liant directement à la région promotrice du LEE1 [222]. Cependant, Ler active lui aussi la transcription de l'opéron *grlAR* [223]. Tout comme Per et Ler, GrlA a une action sur la transcription des facteurs non-LEE. Elle inhibe la transcription de l'opéron *flhd* codant pour un flagelle. Les EHEC comme les EPEC nécessite cette réduction de synthèse des flagelles pour éviter la réponse immunitaire de l'hôte lors des étapes spécifiques de l'infection. En effet, les flagellines H6 et H7 induisent l'attraction de neutrophiles chemoattractants et la synthèse de l'IL-8 [224].

En ce qui concerne GrlR, il inhibe indirectement la transcription du LEE. Il n'entre pas en compétition avec GrlA pour le promoteur de l'opéron LEE1, mais interagit directement avec GrlA, prévenant ainsi le complexe GrlA/ADN [222].

La présence de GrlA et GrlR est nécessaire pour activer la transcription des opérons LEE2 et LEE4 indépendamment de l'activation de Ler. Le changement de transcription de

l'opéron LEE4 est seulement observé en milieu Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) mais pas en LB. GrlA régule les gènes du LEE différemment selon le milieu de culture utilisé. Ceci suggère que GrlA agit de concert avec d'autres régulateurs transcriptionnels: on sait que Ler et GrlA coopèrent pour activer la transcription du LEE2 [225].

La régulation médiée par l'opéron *grlAR* est complexe et encore en cours d'étude.

4.1.4 SepL et SepD

Le LEE encode aussi deux protéines régulatrices SepL et SepD. Ces facteurs influencent à la fois la formation des lésions A/E et la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT. SepL, dont le gène est présent sur le LEE4, est localisée au niveau du cytoplasme. Elle influence seulement la sécrétion des protéines formant le SSTT et non celle des effecteurs. Aucune différence dans la transcription du gène *espB* n'a été observée chez la souche mutante *sepL*. De plus, la mise en place du filament d'EspA est déficiente dans ce mutant *sepL*. Le mutant *sepD* inhibe la sécrétion à la fois des protéines formant le SSTT et des effecteurs. SepD, dont le gène est présent sur l'opéron LEE2, serait donc un composant du SSTT. Le mécanisme exact employé par ces protéines n'est pas encore élucidé, mais on sait que SepL et SepD interagissent ensemble et auraient un rôle dans la hiérarchie de la mise en place du SSTT [226]. Ces protéines n'agissent cependant pas au niveau de la transcription des gènes

Cependant, Per Ler, GrlAR, SepL et SepD permettent une régulation spécifique des facteurs de virulence LEE et non-LEE, mais ils sont sujets eux aussi à une régulation due entre autres aux conditions environnementales.

4.2 Les régulateurs globaux

Les régulateurs globaux agissent aussi bien sur les facteurs de virulence que sur les facteurs non virulents. Chez les AEEC, ils activent généralement la transcription des gènes codant les régulateurs spécifiques. Plusieurs régulateurs interviennent mais nous ne présenterons ici que ceux qui ont été les plus étudiés.

4.2.1 H-NS

La protéine H-NS fait partie des régulateurs globaux utilisés par de nombreuses bactéries pathogènes et répond aux diverses conditions environnementales (variation de la température, de la richesse du milieu, de la présence d'oxygène, de l'osmolarité, de l'acidité). Elle a été identifiée comme se liant fortement à l'ADN au sein des complexes de transcription. Une étude transcriptomique chez une souche EHEC montre que H-NS inhibe 443 gènes et en active 751. De plus, 165 gènes réprimés par H-NS sont activés par Ler et 90 sont activés à la fois par Ler et H-NS.

Parmi les gènes régulés par H-NS, on retrouve ceux codants pour des facteurs de virulence. Chez les AEEC, H-NS réprime la transcription des gènes présents sur les opérons LEE1, LEE2, LEE3 et LEE5 [227] [211]. Chez les EHEC en particulier, il active la transcription de *flhD* et *fliA* qui sont des gènes nécessaires à la biogenèse des flagelles [228].

4.2.2 Le système GAD

La résistance à l'acidité est essentielle à la survie d'*E. coli* dans le tractus gastro-intestinal de l'homme et donc à la colonisation de l'hôte. L'un des trois systèmes communs aux *E. coli* commensales et pathogènes pour contrecarrer à cette acidité est le système GAD qui requiert des isoformes de la glutamate décarboxylase encodés par les gènes *gadA* et *gadB* [229] et une glutamate spécifique, la gamma-aminobutyrate antiporteur (GadC) [230]. Ce système GAD serait régulé par deux répresseurs (H-NS et C réactive protéine (CRP)) et par un activateur (GadX ou YhiX). [231]. GadX permet aux bactéries de répondre aux conditions acides de façon adéquate. En effet, en condition acide comme dans l'estomac, GadX permet l'activation des gènes de tolérance à l'acidité (*gadA*, *gadB*, *gadC*) et la répression des gènes de virulence (*perA*) pour favoriser la survie de la bactérie. Une fois la bactérie arrivée dans l'intestin, le milieu devient plus alcalin, il se produira donc une activation des gènes de virulence et parallèlement, une diminution des gènes de tolérance à l'acidité.

4.2.3 Régulation par les conditions de culture

En fonction des conditions de culture, la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT varie.

Différentes conditions (variations de la température, de pH, d'osmolarité, de la pression partielle en O₂) ont été testées, afin de connaître leur influence sur l'expression des facteurs de virulence des AEEC [46]. L'expression optimale, chez les EPEC, a été observée durant la phase exponentielle de croissance, à une température de 37 °C, à pH 7 et à une osmolarité physiologique, en présence d'ions calcium et de bicarbonate de sodium [107].

Cependant, la sécrétion des protéines qui forment le SSTT est favorisée en milieu DMEM permettant ainsi la mise en place d'un grand nombre de composants du SSTT. En effet, chez les EPEC, on constate une augmentation de la transcription d'environ cinq fois des gènes présents sur les opérons LEE4 et LEE5, de quatre fois pour ceux de l'opéron LEE3 et de huit fois pour *bfp* comparativement au niveau de transcription observé en milieu LB [215], [232], [233].

Chez les EHEC, le milieu Minimal Essential Medium (MEM) est nécessaire pour observer une meilleure sécrétion des protéines effectrices, comparativement au milieu Luria Broth (LB) [234], [235].

Enfin, la concentration de calcium est une condition régulatrice du LEE. En réponse à une faible concentration de cet ion dans le milieu, il y a diminution de la sécrétion des protéines Esp (protéines formant le SSTT) chez EHEC et EPEC [236] [237]. Plus concrètement, au moment de l'infection, la bactérie rencontre du calcium dans les fluides extracellulaires de la lumière intestinale. Elle sécrète alors en premier les protéines qui formeront le SSTT. Ce dernier permettra de connecter le cytosol de la bactérie au cytoplasme de la cellule hôte où les concentrations en calcium sont plus faibles. Ceci entraîne la suppression de la sécrétion des protéines formant le SSTT et l'activation de celle des effecteurs à injecter. La régulation se déroule au niveau post-traductionnel [238].

4.2.4 Quorum sensing (QS)

Le système de QS permet aux bactéries de coordonner leur comportement en particulier lors d'un changement rapide de conditions environnementales afin de survivre. Ces réponses incluent l'adaptation à la disponibilité des nutriments, la défense contre d'autres micro-organismes ainsi que la capacité d'éviter des composés toxiques. Une molécule, l'auto-inducteur, est sécrétée en permanence par les bactéries et agit comme un signal de communication. Cette molécule diffuse librement dans le milieu et peut passer à travers la paroi et la membrane bactérienne. Lorsque la population est plus importante, la concentration en auto-inducteur augmente. A grande concentration, l'auto-inducteur forme un complexe avec un facteur de transcription présent normalement dans la bactérie. Ce complexe permet l'activation d'un ou de plusieurs gènes, produisant ainsi un signal intracellulaire qui confère à la population de nouvelles propriétés qui varient, entre autres, selon l'espèce bactérienne, la nature de l'auto-inducteur et le gène activé. Ces signaux peuvent, notamment coordonner la virulence d'espèces pathogènes [239]. La coordination de l'expression des facteurs de virulence est donc essentielle pour que les bactéries pathogènes puissent réussir l'infection et éviter la réponse immunitaire de l'hôte. Parmi les gènes codants pour des auto-inducteurs, on retrouve le gène *qseA* dont le produit active la transcription des régulateurs spécifiques *ler* [240], *per* et *grlAR* [225]. Cependant, QseA s'auto-réprime. Elle inhibe également les gènes codant les flagelles mais seulement chez les EPEC, pas chez les EHEC [241]. Ceci peut s'expliquer par le fait que les flagelles chez les EHEC sont utilisés en majorité pour le "swimming", et non pour l'adhérence et la formation de microcolonies contrairement aux EPEC [239].

Un système à deux composantes QseBC intervient également dans la régulation par le QS de la pathogenèse des EHEC. QseC, le senseur, s'active en réponse à la présence de l'épinéphrine, de la norépinéphrine ou de l'autoinducteur 3. Une fois activé, il permet l'augmentation de la transcription des gènes *flhDC*, codant pour les flagelles [242]. L'épinéphrine ou la norépinéphrine sont des hormones produites par l'hôte tandis que l'auto-inducteur 3 est produit par la flore intestinale. Ce système n'a pas été démontré chez les EPEC.

Enfin, un autre système à deux composantes QseEF a été découvert chez les EHEC bien qu'on ne connaisse pas encore son fonctionnement. Il a été démontré cependant qu'il

était nécessaire à la formation du piédestal puisqu'il active indirectement la transcription d'*espFu* [243].

La régulation par le QS est différente entre les EHEC et les EPEC. Les EPEC colonisent le petit intestin où il y a peu, voire pas de flore commensale. L'activation du QS chez les EPEC se fait donc par un signal intra-espèce tandis que chez les EHEC, le signal est inter-espèce.

La régulation du LEE est donc un mécanisme complexe qui fait intervenir plusieurs facteurs spécifiques et globaux. Cette régulation varie également entre les souches AEEC, ce qui rend encore plus difficile la compréhension des infections par ces pathogènes.

5 Paa: une nouvelle protéine régulatrice potentielle

5.1 Découverte

Le gène *paa* (porcine attaching effacing associated) a été découvert grâce à la technique de mutagenèse aléatoire par insertion du transposon *TnphoA* dans une souche d'origine porcine EPEC O45 ECL1001 (PEPEC) [2]. Parmi les mutants obtenus, 180 ont été testés dans le modèle d'infection *ex vivo* utilisant des explants d'iléon de porcelet (IVOC). Parmi ces 180 mutants, cinq ont montré une réduction de l'adhérence aux cellules intestinales. Les sites d'insertion du transposon ont été caractérisés chez ces cinq mutants: une insertion dans *osmB* (une lipoprotéine impliquée dans le stress osmotique), deux insertions dans *pstS* (protéine périplasmique qui lie le phosphate), une insertion dans l'*IS100* (séquence d'insertion retrouvée chez *Yersinia*) et une insertion dans un gène encore non caractérisé à l'époque chez un mutant appelé M155. Ce gène nommé *paa* (porcine attaching effacing associated) a été caractérisé par la suite. Il fut réintroduit dans la souche mutante M155 par complémentation, porté par un plasmide pACYC184 dans lequel *paa* était inséré sous le contrôle de son propre promoteur. Ce mutant complétement (M155c), testé dans le modèle *ex vivo*, a démontré que la réintroduction de *paa* lui permettait de retrouver le phénotype de la souche mère. Depuis sa découverte, quelques caractéristiques ont été identifiées.

5.2 Caractéristiques

Le gène *paa* est présent chez la plupart des AEEC dont tous les EHEC O157:H7 [11]. Chez les EHEC O157:H7 EDL933 et Sakai, il est localisée sur un îlot de pathogénicité contenant des gènes ou pseudogènes de phages nommés OI#57 (CP-933O) et Sp9 respectivement. En amont de *paa*, il y a présence d'un gène homologue à *prpH* codant une protéine précurseur du pilus Pap. Chez EDL933, l'îlot OI#57 est de 83 kb de longueur et est inséré entre *yciD* et *ydfJ* à 28,3 min par rapport à *E. coli* K-12. Chez la souche Sakai, l'îlot phagique Sp9 est de 53 kb et est inséré entre *yciD* et *yciE* à 28,3 min de *E. coli* K-12. Les gène *yciD* et *yciE* étant retrouvés à 422 kb de distance sur le chromosome de EDL933, il est évident que cette région a subi au moins une inversion d'une grande séquence d'ADN, ce qui a changé l'environnement de l'îlot OI#57 et ce qui a ajouté des séquences chez EDL933. De nouveaux facteurs impliqués dans le virulence des AEEC ont été découverts sur cet îlot, comme NleA, NleF, NleG, NleH. Paa est également retrouvé chez des souches non-AEEC, comme les ETEC où il est localisé sur un plasmide TENT2 sur lequel sont déjà présents d'autres facteurs de virulence tels qu'une entérotoxine *estA* et un autotransporteur *sepA*. Paa est présent en plus grande proportion chez des souches ETEC isolées au cours des dernières années comparativement à celles isolées vers 1978 [244]. Par contre, *paa* n'est présent qu'en une seule copie dans le génome des souches le possédant.

L'analyse des séquences a révélé un cadre de lecture ouvert de 753 pb codant pour une protéine d'environ 27,6 kDa (251 acides aminés). Elle possède son propre promoteur, une séquence Shine-Dalgarno ainsi qu'un terminateur transcriptionnel. Le contenu en G+C de *paa* est de 44%, et donc plus faible qu'*E. coli* K-12 (50,8%). L'analyse bioinformatique à l'aide des programmes SignalP et PSORTb, a révélé que Paa contient un site de clivage Sec-dépendant après le 18^{ème} acide aminé (alanine) lui permettant d'être exporté dans le périplasme. Par contre, le programme Superfamily prédit que Paa fait partie de la famille des "periplasmic binding protein-like II". Dans la banque de NCBI, on retrouve plusieurs protéines partageant le même domaine lorsque l'on compare les séquences protéiques, dont des protéines étant putativement localisées dans le périplasme et impliquées dans le transport du sulfate et du molybdate.

Le gène *paa* est retrouvé chez 74 % des souches *eae* (intimine) positives. Les souches PEPEC *eae+ / paa-* font cependant moins de lésions A/E, indiquant ainsi un rôle possible de Paa dans la formation des lésions A/E [36].

Paa est difficile à isoler car elle est très faiblement exprimée. Lorsque Paa est présent sur un plasmide à grand nombre de copies comme pCRII chez une souche complémentée, la croissance bactérienne est ralentie. Par contre, sa présence sur un plasmide à faible copie n'affecte pas la croissance. La surexpression de Paa pourrait donc être toxique pour la bactérie [2].

Paa est localisée dans le périplasma chez les souches EHEC O157:H7 EDL933 et ETEC et possède un "sulfate-binding domain" également retrouvé chez Sbp (Sulfate binding protein) de *Salmonella* [244]. Elle présente des similarités de séquence avec EHEC O157:H7 (100%), les ETEC (95-100%), et avec les protéines AcfC (Accessory colonization factor C) (49%) et PEB3 (51,8%) impliquées dans la virulence de *Vibrio cholerae* et *Campylobacter jejuni*, respectivement. À cause de leur similarité avec Paa, ces deux protéines sont présentées dans les paragraphes suivants.

5.2.1 AcfC

AcfC fait partie d'un système nommé ACF pour Facteur de Colonisation Accessoire qui est requis pour une infection efficace (modèle murin) chez *V. cholerae* [245]. Les gènes codant l'ACF (*acfABCD*) font partie de l'îlot VPI (*Vibrio* pathogenicity island I) qui contient les gènes de phage et inclut aussi les gènes *tcp* (Toxin co-regulated pilus) codant pour le pili de type IV impliqué dans l'adhérence de *Vibrio* [246]. TCP est considéré comme un facteur majeur dans la colonisation intestinale par *V. cholerae*. ACF est régulé par le même système qui contrôle l'expression de la toxine cholera. AcfC a été retrouvé dans le surnageant de culture de *V. cholerae* 0395, mais sa localisation précise n'est pas connue.

5.2.2 PEB3

PEB3 est présente chez *Campylobacter jejuni*, pathogène du petit intestin causant la diarrhée chez l'humain. La protéine PEB3, de 25,4 kDa, a été purifiée par la méthode d'extraction acide qui permet d'isoler spécifiquement des protéines de la surface bactérienne [247]. Elle partage des homologies de séquences significatives avec la piline de classe I de *Neisseria meningitidis*, avec la sous-unité B de l'entérotoxine LT d'*E. coli* et avec des protéines périplasmiques de classe II. L'étude de PEB3 native par spectrométrie de masse a révélé que celle-ci portait un heptasaccharide, composé d'un chaîne linéaire de

1-D-BAC (Bacilosamine) et de 5-GalNac (Acétylglucosamine) avec une branche de D-Glc (Glucose) sur un résidu asparagine [248], [249].

Cette protéine majeure de surface a montré une bonne réactivité envers des antisérums de patients ayant souffert de diarrhée à *C. jejuni* ou *C. coli* indiquant un caractère immunogène. Elle semble donc être une candidate adéquate pour évaluer la réponse immunitaire durant une infection à *C. jejuni* [247]. PEB3 ne semble pas être une protéine transmembranaire. Elle contient un haut pourcentage en lysine, elle ne possède pas de cystéine, et est clivée au niveau post-traductionnel. Elle est capable de lier la "Soy Bean Agglutinine" (SBA), une lectine, démontrant ainsi que PEB3 est glycosylée. La glycosylation des protéines est essentielle à l'adhésion et à la colonisation. La propriété d'adhésine de PEB3 a été démontrée en modèle de culture de cellules Hep-2. L'étude de la structure de PEB3 montre qu'elle peut agir à la fois comme une adhésine et comme composant d'un système de transport. Elle possède un domaine de liaison au citrate qui la relie à la fonction de transport d'acides bi- ou tricarboxyliques tout comme Paa [250].

En 2000 *C. jejuni* NCTC1168 a été séquencé [251]. Ceci a permis de constater que *peb3* ne semble pas être présent sur des séquences de bactériophages insérés dans le chromosome.

5.3 Projet Paa

5.3.1 Souches utilisées

Au cours ma maîtrise, trois différentes souches possédant Paa ont été utilisées: une souche EPEC porcine, une souche EPEC lapine et une souche EHEC humaine. Les caractéristiques de chacune de ces souches sont présentées ci-dessous.

5.3.1.1 EPEC porcine (PEPEC) ECL1001 (anciennement 86-1390)

Chez le porc, la souche souvent retrouvée dans les cas de diarrhée post-sevrage est une souche *E. coli* de sérogroupe O45. Parmi ce sérogroupe, on retrouve la souche ECL1001 (O45:H-) isolé au Québec. La souche PEPEC ECL1001 est une EPEC atypique: elle ne possède pas le plasmide EAF qui contient les gènes *bfp* codant les protéines BFP [36]. Elle est capable de former les lésions A/E en modèle *in vitro* et *ex vivo*. Les lésions A/E observées en modèle *ex vivo* avec ECL1001 sont comparables à celles observées avec les souches humaines AEEC dans des explants du duodénum humain [36]. Le LEE est

présent chez ECL1001 [252]. La région du LEE est assez conservée chez les différentes souches AEEC isolées de divers animaux. Le LEE est inséré dans le locus sélénocystéine ARNt (*selC*) chez la souche EPEC humaine E2348/69 et EHEC O157:H7 de même que chez la souche ECL1001 mais diverge pour les autres souches PEPEC. Les gènes présents sur le LEE comme *espA*, *aeae*, *espB* et *espD* sont homologues à ceux présents chez les autres AEEC. La comparaison des Esp montrent qu'EspA d'ECL1001 (20 kDa) a 88% d'identité de séquence avec la souche EPEC humaine E2348/69, qu'EspB (33 kDa) a 70% d'homologie avec E2348/69 et EHEC O157:H7. Un autre gène du LEE, *aeae*, a été caractérisé comme codant pour une protéine intimine de 97 kDa de type β . Il semblerait que la quantité d'intimine produite soit directement corrélée avec la sévérité des lésions A/E induites par les souches PEPEC *in vivo* [36].

Cette souche est donc un bon modèle pour l'étude de la pathogénicité des AEEC, puisqu'elle a notamment permis l'identification de Paa comme nouveau facteur de virulence. De plus notre laboratoire possède la souche sauvage ECL1001, la souche mutée pour *paa* M155 et la souche complémentée M155c.

5.3.1.2 La souche REPEC E22 (Rabbit EPEC)

Cette souche EPEC, de sérotype O103:H2, a été isolée de lapin atteints d'entérites [253]. Elle possède le LEE et les similarités de séquences ont été déterminées avec d'autres souches AEEC. L'intimine de type β présente 99% de similarité avec celle d'ECL1001. La protéine EspA présente 98% d'identité avec celle d'ECL1001. Une homologie de 99% a été observée avec EspB d'ECL1001. Comme une différence a été observée avec l'intimine, une différence existe aussi au niveau de Tir (99% d'identité avec Tir d'ECL1001) [254].

La souche E22 a souvent été utilisée comme modèle, puisque les EPEC n'ont pas la capacité d'infecter les lapins et les rongeurs en général. La souche E22 cause la diarrhée chez les lapins sevrés, de même que des changements histologiques similaires à ceux induits par les EPEC, à savoir les lésions A/E sur la muqueuse intestinale [255]. Il a de plus été démontré que le lapin est un modèle efficace afin d'étudier l'expression du phénotype A/E.

Les caractéristiques proches d'E22 avec ECL1001 en font un excellent modèle pour l'étude des AEEC. Tout comme ECL1001, notre laboratoire possède la souche sauvage E22, la souche mutée pour *paa* E22 Δ *paa* et la souche complétée E22 Δ *paa*FGC.

5.3.1.3 La souche humaine EHEC O157:H7 EDL933

Il s'agit d'un des pathogènes AEEC de l'humain le plus important à l'heure actuelle. La souche EHEC O157:H7 est un pathogène zoonotique qui cause des colites hémorragiques et des SHU. La transmission de cette souche se fait par l'ingestion entre autres d'aliments contaminés tels que de la viande insuffisamment cuite ou de l'eau souillée. Chez les ruminants elle fait partie de la flore normale, par contre chez l'homme, elle peut conduire à la mort. Il existe des différences dans la pathogénicité avec les souches EPEC, ces dernières ont été soulignées au cours de cette revue de littérature.

La séquence complète du génome d'EHEC O157:H7 EDL933 a été publiée, ce qui facilite l'étude de cette souche. On retrouve 177 îlots O-spécifiques (1,3 Mb d'ADN) chez O157:H7 qui sont absents chez des *E. coli* non pathogènes [15]. La majorité des facteurs de virulence sont présents sur ces îlots O (Figure 15).

La similarité de séquence des gènes du LEE avec celle d'E22 a été examinée: le niveau d'homologie avec EspA est de 85%, 70,4% avec EspB, 72% avec Tir et 82% avec l'intimine. De plus, *paa* est présent sur l'îlot OI#57 (CP-933O) où d'autres facteurs de virulence ont depuis peu été identifiés [143].

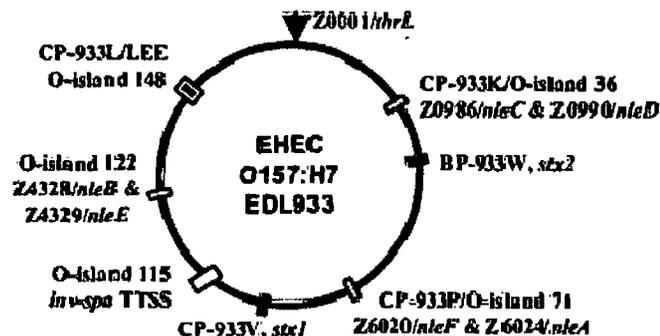


Figure 15: Diagramme montrant la localisation des îlots O codant les six effecteurs non-LEE identifiés dans le génome de la souche EHEC O157:H7 EDL933. Localisation également des gènes *stx*, du LEE, de *inv-spa* TTSS et phages associés (CP-BP) [143].

5.3.2 Description du projet

Paa semble intervenir dans la formation des lésions A/E, puisque des souches dont le gène *paa* a été muté, perdent le phénotype A/E [2]. L'implication de Paa dans la cascade d'évènements menant au phénomène de lésions A/E n'est pas connue. Puisque la formation des lésions A/E est dépendante de la mise en place du SSTT et de l'injection des effecteurs, nous émettons l'hypothèse que Paa influence l'action de protéines secrétées par le SSTT. Paa pourrait exercer son influence en affectant la sécrétion et/ou la production des protéines dépendantes du SSTT. Il pourrait également influencer la transcription des gènes codant pour les protéines dépendantes du SSTT. L'objectif de cette étude est de mieux déterminer le rôle de Paa dans le développement des lésions A/E. Nous avons d'abord caractérisé par la méthode du choc osmotique la localisation cellulaire de Paa chez la souche d'origine porcine EPEC ECL1001. Nous avons ensuite observé son influence sur la sécrétion et la production des protéines dépendantes du SSTT. L'analyse des surnageants de culture et des culots bactériens a ainsi été effectuée chez les souches EPEC porcines sauvages, mutées et complémentées. Nous avons aussi examiné l'influence de Paa sur la transcription des gènes codant des protéines dépendantes du SSTT. Une étude transcriptionnelle par RT-PCR quantitative a été réalisée pour évaluer l'expression relative des gènes codants pour des protéines dépendantes du SSTT. Enfin, nous avons déterminé si l'influence de Paa est dépendante de son niveau d'expression. La surexpression de Paa à l'aide du plasmide pTrc99a a été effectuée chez les souches sauvages EPEC ECL1001 et EHEC O157:H7 EDL933. Les effets de cette surexpression ont été analysés sur les protéines du SSTT par SDS-PAGE et Western blot avec des anticorps de détection anti-Paa, anti-EspB, anti-EspA, et anti-Tir.

MÉTHODOLOGIE ET RÉSULTATS

Article:

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

(en préparation)

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

É. Destable¹, F. Berthiaume¹, B. Pauchet¹, J. Fairbrother¹, M. Mourez¹, *J. Harel¹

*Corresponding author. Mailing address:

¹Département 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 [7]. 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 which 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. [8]

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 [7]. Interactions between translocated Tir, EspF_U (also known as TccP), and host proteins are thought to promote actin polymerization in host cells, resulting in pedestal formation [9].

Another non-LEE factor called porcine attaching effacing associated gene (*paa*) was identified in the porcine EPEC (PEPEC) strain ECL1001 by *TnphoA* mutagenesis [5, 10]. *Paa* was shown to be required for A/E lesions formation *ex vivo* [5, 10]. The *paa* open reading frame of 753 bp encodes a 27.6 kDa protein, the sequence of which is identical to AdfO of EHEC O157:H7 EDL933 and Sakai strains [11]. The gene *paa/adfO* is located within a cryptic prophage island in O island 57 and Sp9 respectively in EDL933 and Sakai [12]. 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 plasmid used for this study are listed in Table 1. For the detection of proteins secreted and RT-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_{600nm} 1). MEM is used to enhance expression and secretion of EPEC effectors [13]. 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.

An antibiotic resistance gene-marked deletion of *paa* in EDL933 was made using the lambda red recombinase-based gene replacement system [1]. Plasmid pSB315 [3] 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 a plasmid pTrc99a::*paa* expressing Paa, the DNA sequence containing the *paaH* 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 α Pir, 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 [14]. 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 MgSO₄, 0.1 M PMSF and pelleted again. The supernatants were filtered with a 0.2 µm 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 lysosome EDTA extraction [15]. Briefly, 100 ml bacterial cultures are centrifuged for 10 min. 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 µL for 800 µL 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 [16] 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_{600nm} 1. Bacteria and cell debris were harvested by two centrifugations at 3,700g 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 min and incubated with

a 1:2,000 dilution of either an anti EspA, EspB and Tir chicken polyclonal antibodies [5, 17], a 1:2,000 dilution of anti-Paa rabbit polyclonal antibody [12] 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). Q-PCR was performed by using the QuantiTect SybrGreen PCR Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario) according to the manufacturer's instructions q-RT-PCR were performed on a Smart Cycler system (Cepheid, Sunnyvale, USA). For each q-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 [18]. 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 1.7×10^6 IPEC-J2 cells in 0.5 ml DMEM-F12 (Gibco BRL, Burlington, Canada) supplemented with 5% Fetal Bovine Serum (FBS, Gibco BRL, Burlington, Canada), 5ng/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 4h 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, 5ng/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 hours 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 [7]. 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 (OsO₄). Tissues were then rinsed in water for 1.5 h 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 \pm 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 [5]. 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* homology with Paa

was obtained by this method [19]. 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 [5]. 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 [8]).

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 strains 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 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 wild type strain overexpressing Paa, DST03, 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 pTrec99a:*paa* where *paa* gene is under control of

IPTG. In these conditions not only is the secretion of EspA, EspB and Tir 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). Sequencing of some of the proteins identified the autotransporter SepA and a hypothetical protein Z1479 of *E. coli* of strain O157:H7 EDL933. The gene is part of phage BP-933W genome carrying *stx2* toxin gene. Paa also influenced the secretion pattern of the EHEC human mutant *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 these 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 gene (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 [20]. The *paa* gene is present in all strains of O157:H7 EHEC and in many other types of AEEC [11, 12]. 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 from Quebec, was periplasmic [12]. 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 [19]. 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-associated pilus of *V. cholerae* [21]. AcfC was shown to be in the culture supernatant of *V. cholerae*, but its definitive localization has not yet been determined [22]. 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 [5]. 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 [5]. 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 on 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. Other proteins like SepA, an autotransporter and an unknown protein Z1479 which is present in a phage-related genomic

islet called O45 were identified. 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 [23]. In addition, several other regulators have been implicated in the control of LEE genes at the transcriptional level, including Per [24, 25], GadX [26], H-NS [23, 27], *hha* [28], *pch* [29], IHF [30], EtrA and EivF [31]. 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. genes encoding proteins depending on TTSS not 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 [9]. 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 [9].

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 [5]. 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 [33]. 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 [5, 9] 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 (FORNT) (121927) and, Centre de Recherche en Infectiologie Porcine (CRIP) (11946).

References

1. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
2. Helie, P., et al., *Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing Escherichia coli O45:K"E65" strain*. Infect Immun, 1991. **59**(3): p. 814-21.
3. Galan, J.E. and R. Curtiss, 3rd, *Expression of Salmonella typhimurium genes required for invasion is regulated by changes in DNA supercoiling*. Infect Immun, 1990. **58**(6): p. 1879-85.
4. Dezfulian, H., D. Tremblay, and J. Harel, *Molecular characterization of extraintestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC) pathogenicity islands in F165-positive E. coli strain from a diseased animal*. FEMS Microbiol Lett, 2004. **238**(2): p. 321-32.
5. Batisson, I., et al., *Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing Escherichia coli*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4516-25.
6. Perna, N.T., et al., *Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Nature, 2001. **409**(6819): p. 529-33.
7. Girard, F., et al., *Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 6005-16.
8. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
9. Ho, T.D., et al., *Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic Escherichia coli adherence and intestinal colonization*. Infect Immun, 2008. **76**(5): p. 1858-65.
10. Zhu, C., et al., *Virulence properties and attaching-effacing activity of Escherichia coli O45 from swine postweaning diarrhea*. Infect Immun, 1994. **62**(10): p. 4153-9.
11. An, H., et al., *Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric Escherichia coli*. Adv Exp Med Biol, 1999. **473**: p. 179-84.
12. Leclerc, S., et al., *paa, originally identified in attaching and effacing Escherichia coli, is also associated with enterotoxigenic E. coli*. Res Microbiol, 2007. **158**(1): p. 97-104.
13. Yoh, M., et al., *Effect of environmental conditions on proteins secreted by enterohemorrhagic Escherichia coli O26:H11*. Microbiol Immunol, 2003. **47**(1): p. 1-6.
14. Bosse, M., et al., *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, 1993. **139**(3): p. 631-8.
15. Betton, J.M., et al., *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, 1996. **262**(2): p. 140-50.
16. Mourez, M., et al., *Heat shock induction by a misassembled cytoplasmic membrane protein complex in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1997. **26**(4): p. 821-31.

17. Girard, F., et al., *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, 2006. **46**(3): p. 340-50.
18. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $[\Delta\Delta]$ CT Method*. 2001. **25**(4): p. 402.
19. Pei, Z.H., R.T. Ellison, 3rd, and M.J. Blaser, *Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of Campylobacter jejuni*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16363-9.
20. Dezfulian, H., et al., *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, 2003. **41**(4): p. 1375-85.
21. Peterson, K.M. and J.J. Mekalanos, *Characterization of the Vibrio cholerae ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization*. Infect Immun, 1988. **56**(11): p. 2822-9.
22. Everiss, K.D., K.J. Hughes, and K.M. Peterson, *The accessory colonization factor and toxin-coregulated pilus gene clusters are physically linked on the Vibrio cholerae 0395 chromosome*. DNA Seq, 1994. **5**(1): p. 51-5.
23. Haack, K.R., et al., *Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 384-92.
24. Gomez-Duarte, O.G. and J.B. Kaper, *A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 1995. **63**(5): p. 1767-76.
25. Russell, R.M., et al., *QseA and GrlR/GrlA regulation of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2007. **189**(14): p. 5387-92.
26. Shin, S., et al., *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, 2001. **41**(5): p. 1133-50.
27. Bustamante, V.H., et al., *Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic Escherichia coli: Ler antagonizes H-NS-dependent repression*. Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 664-78.
28. Sharma, V.K. and R.L. Zuerner, *Role of hha and ler in transcriptional regulation of the esp operon of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. J Bacteriol, 2004. **186**(21): p. 7290-301.
29. Iyoda, S. and H. Watanabe, *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, 2004. **150**(Pt 7): p. 2357-571.
30. Yona-Nadler, C., et al., *Integration host factor (IHF) mediates repression of flagella in enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 4): p. 877-84.
31. Zhang, L., et al., *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, 2004. **72**(12): p. 7282-93.
32. Bergholz, T.M., et al., *Global transcriptional response of Escherichia coli O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 97.

33. Tobe, T., et al., *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, 2006. **103**(40): p. 14941-6.

Legends

FIGURE 1. Localisation of Paa in the porcine EPEC 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 α -Paa of the bacterial fractionation of the strain M155c. Western blot samples were resolved on SDS-12% polyacrylamide gels.

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

FIGURE 3. Subcellular localization of Paa. 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 β -lactamase absorbance, using the 4 fractions of ice-cold osmotic shock of M155c ; (B) Western blot analysis of cultures of M155c (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; Lane 3, DST01; Lane 4, M155; Lane 5, DST02; Lane 6, MG1655 K-12; Lane 7, EDL933; Lane 8, DST03; Lane 9, DST04; Lane 10, DST05.

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, 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; Lane 2, ECL1001; Lane 3, DST01; Lane 4, M155; Lane 5, DST02; Lane 6, MG1655 K-12; Lane 7, EDL933; Lane 8, DST03; Lane 9, DST04; Lane 10, DST05.

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 | [4] |
| ECL1001 | PEPEC O45 paa+ | The <i>E. coli</i> Laboratory [2] |
| DST01 | ECL1001 pTrc99a::paa | This study |
| M155 | ECL1001 paa::TnphoA | [5] |
| DST02 | M155 pTrc99a::paa | This study |
| M155c | M155 pACYC184::paa | [5] |
| EDL933 | EHEC O157:H7 paa+ | [6] |
| DST03 | EHEC O157:H7 paa+ | This study |
| DST04 | EDL933Δpaa::km | This study |
| DST05 | EDL933Δpaa::km pTrc99a::paa | This study |
| ECL8559 | ETEC O149 paa+ | The <i>E. coli</i> Laboratory [2] |
| Plasmid | | |
| pTrc99a | Double strand-DNA 4176 BP | Pharmacia Biotech |
| pKD46 | Double strand-DNA 4176 BP 6329 bp; Red recombinase plasmid pKD46 | [1] |
| pSB315 | Source of terminatorless Km cassette: Km ^r | [3] |

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 | 1 200 |
| <i>paakmrev</i> | TCA AGT GCC TTT CCT GGT CCA GCC ATA TTT TTT GAA TGC AGG CGC CGC TTC CCC GGA TCC GTC GAC CTG CAG | |
| <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, M155 and M155c as measured by quantitative real-time RT-PCR. Strains were grown to OD_{600nm} 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.

| Genes | ECL1001 vs M155 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ | M155 vs M155c $2^{-\Delta\Delta Ct}$ |
|-------------|---|---|
| <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 |

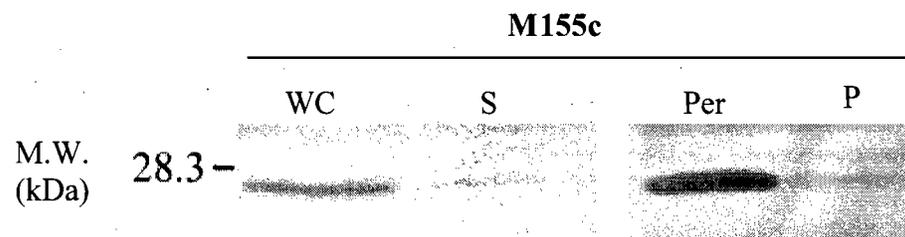


Figure 1.

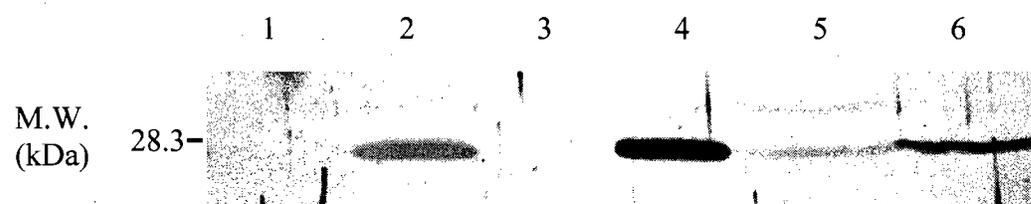
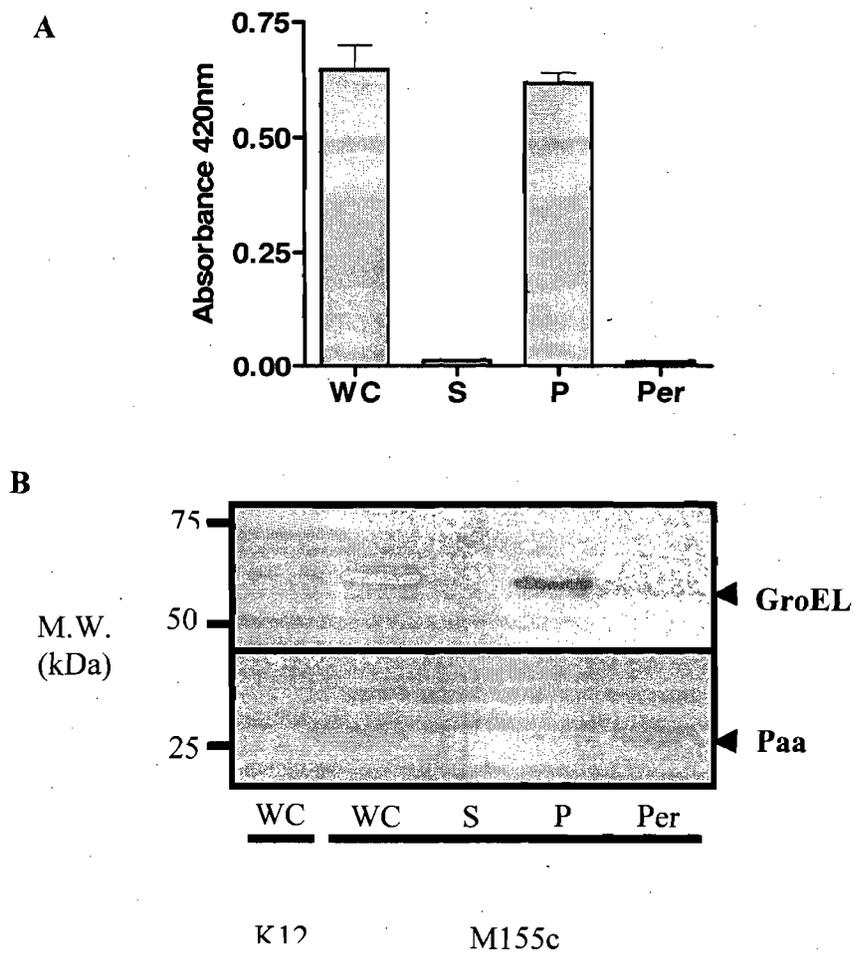


Figure 2.

**Figure 3.**

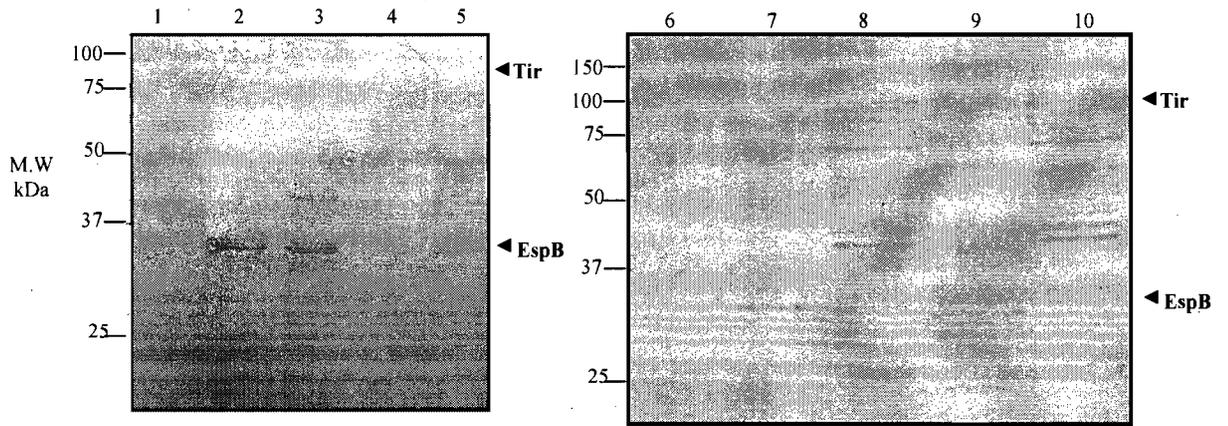


Figure 4.

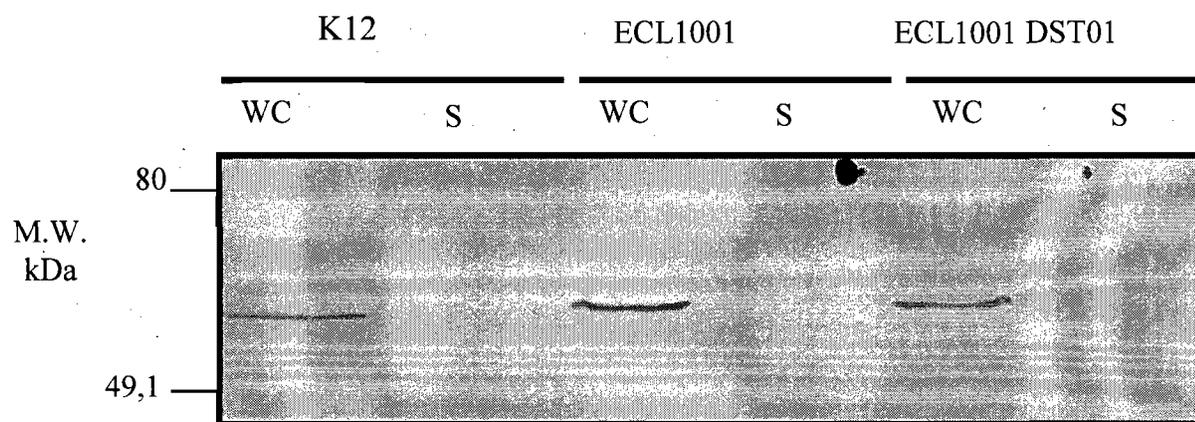
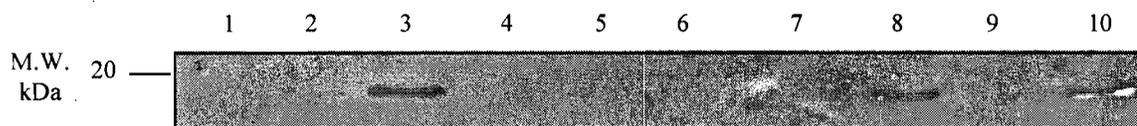
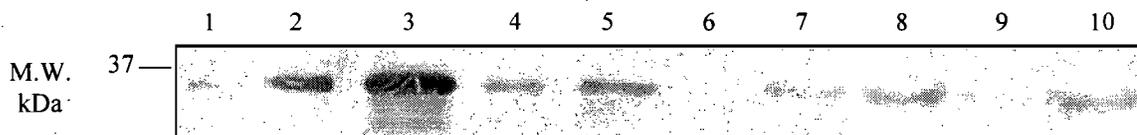
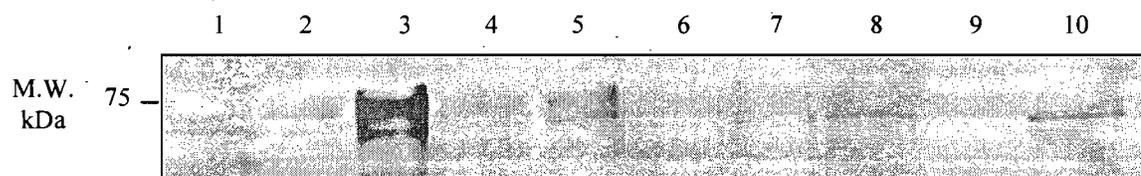


Figure 5.

**Figure 6A.****Figure 6B.****Figure 6C.**

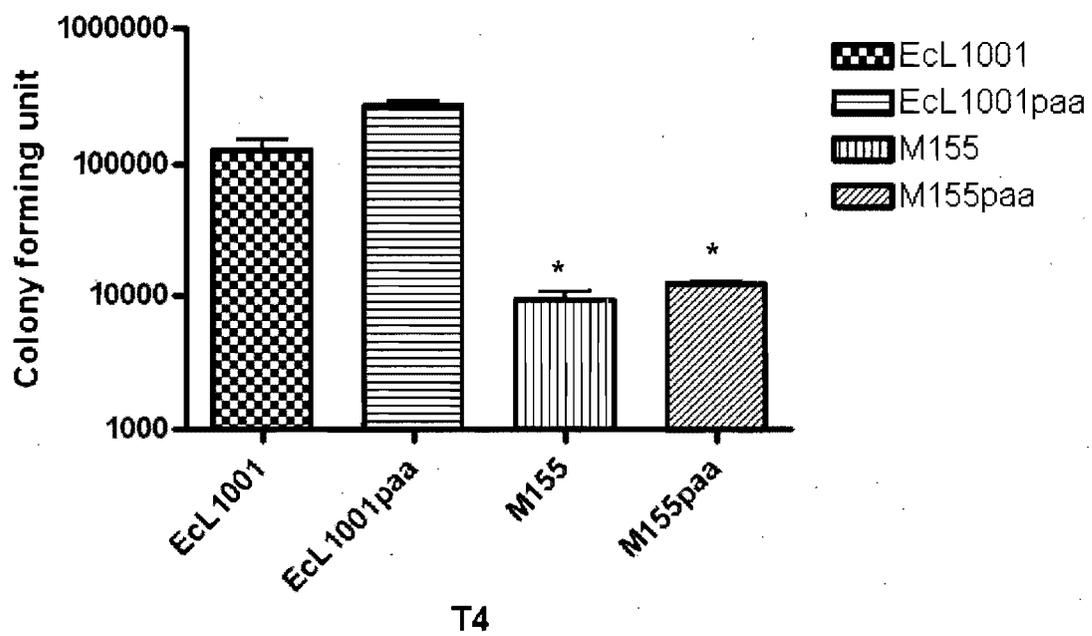


Figure 7.

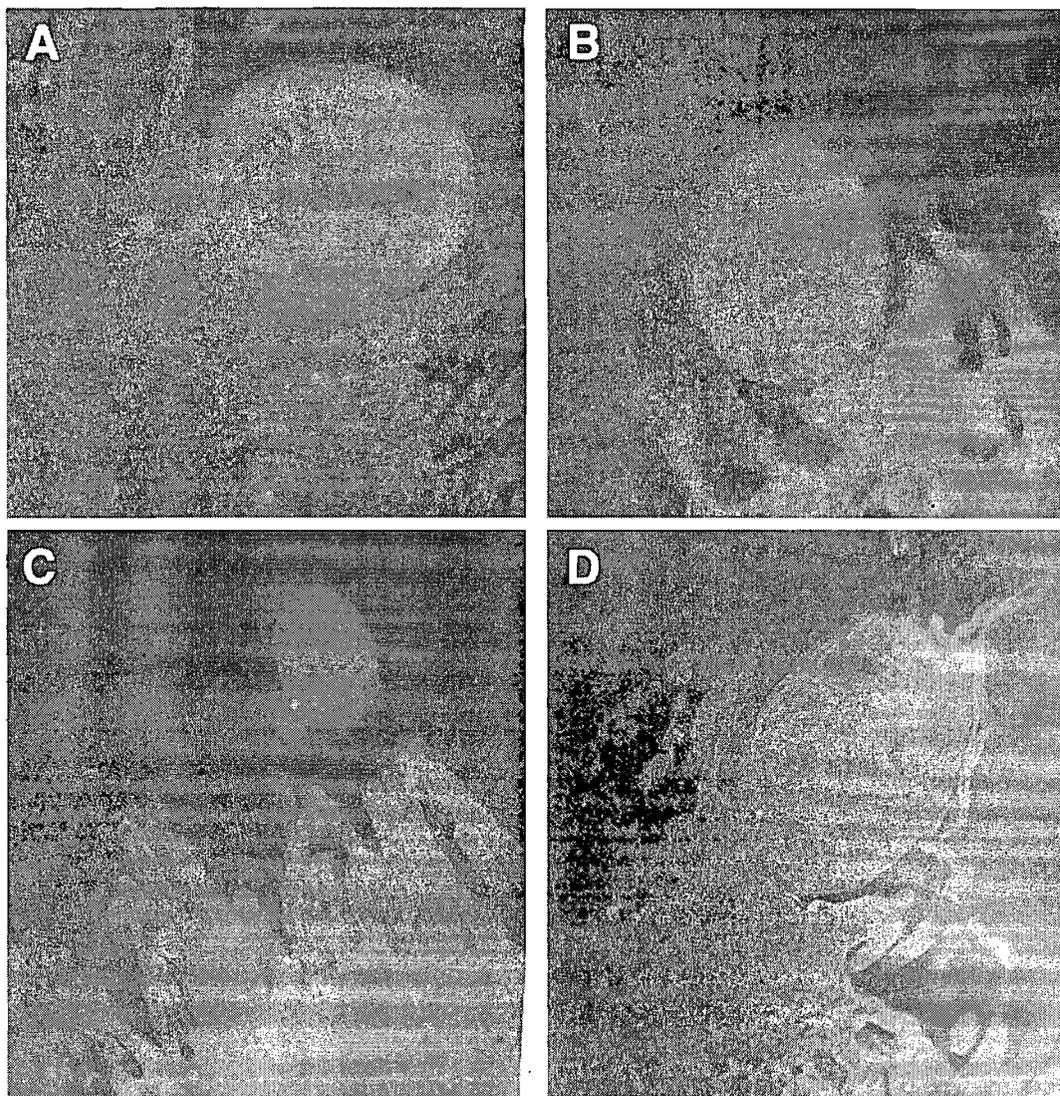


Figure 8.

DISCUSSION

Discussion

Localisation cellulaire de Paa chez la souche PEPEC ECL1001

Afin de vérifier la localisation cellulaire de Paa chez la souche d'origine porcine EPEC ECL1001, un fractionnement cellulaire par choc osmotique a été réalisé. La production de Paa étant faible dans la souche sauvage ECL1001, nous avons donc utilisé la souche complémentée M155c. Dans cette souche *paa* est porté par le plasmide pACYC184 à nombre de copies moyen donc le niveau de production de Paa devrait être plus élevé que dans la souche sauvage. Chez cette souche, Paa n'est pas sécrété et se retrouve associé à la bactérie. Il est présent dans la fraction périplasmique en grande quantité mais elle est également retrouvée en plus faible proportion dans la fraction cytoplasmique. Dans nos conditions, Paa se retrouve au niveau du périplasme bactérien chez la souche M155c. Ce résultat est en accord avec les analyses bio-informatiques de la séquence protéique de Paa. Les programmes d'analyses pSORTb, Kyte et Doolittle indiquent que Paa est une protéine périplasmique hydrophile composée d'hélices alpha et de domaines beta et qu'elle possède un signal Sec-dépendant. Elle semblerait donc être exportée du cytoplasme bactérien vers le périplasme via le système de sécrétion Sec. De plus, Paa a été identifié comme étant une protéine périplasmique dans plusieurs souches ETEC isolées au Québec, ainsi que dans la souche EHEC O157:H7 EDL933 [244]. Cependant, une étude contradictoire réalisée avec la souche PEPEC ECL1001 a détecté Paa au niveau de la surface bactérienne. Des anticorps anti-His-Paa couplés à des billes d'or ont été utilisés chez les souches ECL1001, M155 et M155c. Les observations en microscopie électronique ont permis d'identifier Paa à la surface bactérienne chez la souche sauvage et complémentée. Néanmoins le nombre de billes d'or observées chez ces souches était trop faible et serait peut-être dû à une réaction non-spécifique de l'anticorps [2]. Dans nos conditions, Paa est une protéine périplasmique bactérienne, mais il est possible qu'elle se retrouve associée à la surface ou qu'elle soit sécrétée par la bactérie dans d'autres conditions de culture.

Influence de Paa sur la sécrétion des protéines

L'implication de Paa dans les lésions A/E a été prouvée dans le modèle d'infection IVOC (*in vitro* Organ Culture) de porcelet [2]. La mutation créée par l'insertion du transposon *TnpHoA* dans le gène *paa* de la souche PEPEC ECL1001, a significativement diminué l'adhérence de cette souche alors que la complémentation en trans du gène *paa* a restauré la capacité des souches à causer des lésions A/E [2]. Puisque ces lésions sont dépendantes de la mise en place du SSTT et de l'injection des facteurs de virulence, nous avons émis l'hypothèse que Paa influe sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT.

1. Influence de Paa sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT chez la souche d'origine porcine ECL1001 et d'origine humaine EDL933 et sur l'adhérence bactérienne et la formation de lésions attachantes et effaçantes

L'analyse du surnageant de culture des souches sauvages ECL1001 et EDL933, des souches mutées *paa* M155 et DST04 respectivement et des souches complémentées DST02 et DST05 a été réalisée. La sécrétion des protéines dépendantes du SSTT est diminuée chez les souches mutées M155 et DST04 comparativement aux souches sauvages ECL1001 et EDL933. La complémentation restaure la sécrétion. Les protéines affectées sont à la fois celles qui forment le SSTT (EspA et EspB) et celles qui sont injectées dans le cytoplasme de l'hôte (Tir). Dans nos conditions, Paa influence la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT.

De plus, la surexpression de Paa dans les souches sauvages PEPEC ECL1001 et EHEC O157:H7 EDL933 montre une augmentation de la sécrétion de diverses protéines (15 à 110 kDa) dont celles dépendantes du SSTT (EspA, EspB et Tir). L'effet de Paa sur la sécrétion des protéines du SSTT est dépendant de son expression. Chez la souche EHEC O157:H7 Sakai, le gène *paa* est localisé sur un îlot phagique Sp9, où se trouvent en amont, des gènes codant pour des effecteurs récemment identifiés à savoir *nleA*, *nleF*, *nleG*, *nleH*, et *espM* dont le rôle dans la pathogénicité est en cours d'étude (Tableau I) [209]. NleA compromet le transport des protéines du réticulum endoplasmique vers l'appareil de Golgi en inhibant les vésicules de transport COPII [200]. EspM module le cytosquelette d'actine en ciblant les Rho GTPases de l'hôte [197]. NleF, NleG, NleH ne semble pas contribuer à la formation du piédestal [205], [203], [209]. Puisque *paa* est également présent sur cet îlot,

il pourrait favoriser leur sécrétion. Jusqu'à présent, ces protéines n'ont pu être identifiées que dans le surnageant de culture de la souche EHEC O157:H7 EDL933 surexprimant *paa*.

| Effecteur | Sakai ID | Famille | Contexte | Preuve d'effecteur |
|-----------|-----------|---------|----------|--------------------|
| NleG2-1' | ECs1810/1 | NleG | Sp9 | S ψ |
| NleA | ECs1812 | NleA | Sp9 | S |
| NleH1-2 | ECs1814 | NleH | Sp9 | SCFB |
| NleF | ECs1815 | NleF | Sp9 | SB |
| EspO1-2 | ECs1821 | OspE | Sp9 | H |
| NleG | ECs1824 | NleG | Sp9 | SF |
| EspM1 | ECs1825 | IpgB | Sp9 | SF |
| NleG9' | ECs1828 | NleG | Sp9 | H ψ |

Tableau I: effecteurs présents sur l'îlot Sp9 chez EHEC O157:H7 Sakai. Preuve de sécrétion des protéines. S, détecté dans le surnageant du mutant $\Delta sepL$; C, translocation détectée par l'utilisation de la fusion CyA; F, translocation détectée par l'utilisation du tag FLAG; B, translocation détectée par l'utilisation de la fusion avec la β -lactamase; H, homologue à des effecteurs connus mais non confirmé par des essais de translocation. ψ , potentiel pseudogène [209].

Comment Paa agit sur le niveau de sécrétion des protéines dépendantes du SSTT? Il pourrait activer indirectement la transcription du gène codant pour le régulateur principal du LEE, Ler. Ler active la transcription des autres opérons du LEE [34]. Cependant, nos résultats non significatifs obtenus en RT-PCR quantitative montrent une légère influence de Paa sur *ler* mais aucune sur les autres opérons. Dans nos conditions Paa n'affecte pas de manière significative et indirecte la transcription des gènes du LEE. Ces expériences ont été réalisées en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire. À cette étape, nous ignorons le niveau d'expression du gène *paa* et des gènes du LEE dans la souche d'origine porcine ECL1001 ainsi que dans la souche EHEC O157:H7 Sakai. Une étude sur l'expression globale transcriptionnelle au cours de la croissance de la souche EHEC O157:H7 Sakai révèle que l'expression de Paa est diminuée lorsque la bactérie est en fin de phase exponentielle/début de phase stationnaire. L'expression optimale de Paa a lieu en fin de phase stationnaire [256]. Il serait donc intéressant de vérifier la transcription des gènes

du LEE et de certains effecteurs au moment où *paa* est le mieux exprimé. On peut émettre l'hypothèse que Paa influe sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT à un certain stade de croissance bactérienne.

Si Paa n'influence pas la transcription des gènes, il est possible qu'il affecte la production des protéines. L'analyse des culots bactériens des différentes souches ne montre aucune influence de Paa. Dans nos conditions, Paa n'interfère pas avec la production des protéines dépendantes du SSTT.

Il est possible que Paa favorise la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT en permettant une mise en place fonctionnelle du système au niveau périplasmique. Une étude récente utilisant la souche EHEC O157:H7 EDL933 montre que Paa favorise la sécrétion des protéines dépendantes du système de sécrétion de type II [257]. Un mutant *paa*, renommé *adfO* (adherence factor encoded on CP-933O phage) dans cette étude, présente une diminution dans l'adhérence aux cellules HeLa et une diminution dans la sécrétion de protéines. En effet, le mutant *adfO* diminue la sécrétion de YodA, protéine dépendante du système de sécrétion de type II dont les gènes *etp* sont portés par le plasmide pO157. La protéine YodA et le système de sécrétion de type II participent directement à l'adhésion de EDL933 aux cellules HeLa. Le mécanisme par lequel AdfO/Paa favorise la sécrétion des protéines dépendantes du système de sécrétion de type II n'est pas connu.

Alors que la mutation dans *paa* affecte l'adhérence des souches AEEC, les effets de cette mutation sur la sécrétion semblent divers. Nous observons que la mutation *paa* influence la sécrétion des protéines du SSTT mais aussi d'autres protéines et l'étude de Ho et al. met en évidence l'influence de Paa/AdfO sur le système de sécrétion de type II [257]. Dans notre étude, nous avons principalement utilisé une souche d'origine porcine EPEC. Puisque des différences génétiques et fonctionnelles existent entre les souches AEEC, il est aussi possible que la régulation de leurs facteurs de virulence soit également différente. De plus, pour mettre en évidence les effets de la mutation sur la sécrétion des protéines, les conditions de milieu entre les deux études sont différentes. Dans l'étude de Ho et al. la souche EHEC O157:H7 EDL933 est cultivée dans un milieu M9 complété avec 0,2% de glucose et 0,2% de casamino acides alors que nous avons utilisé des conditions où les souches sont cultivées dans un milieu MEM ce qui favoriserait la sécrétion des effecteurs du SSTT [234], [235]. Notre étude et celle de Ho indiquent que Paa a un effet sur le

mécanisme d'infection des AEEC. Cependant, peut-être que pour des raisons de conditions expérimentales, certains résultats sont différents.

Comme Paa influence le niveau de sécrétion des protéines dépendantes du SSTT, l'importance de Paa dans l'adhérence et la formation des lésions A/E aux cellules intestinales porcines IPEC-J2 a été testée. Paa influence l'adhérence de la bactérie aux cellules IPEC-J2 puisque comparativement à la souche sauvage ECL1001, l'adhérence de la souche mutante M155 est diminuée. Par contre, la complémentation du mutant avec le plasmide surexprimant *paa*, ne restaure pas l'adhérence. Paa agit aussi sur le phénomène d'adhérence intime et de formation de lésions de type A/E puisque la souche Paa mutante M155 ne démontrait plus ces caractéristiques qui étaient observées chez la souche sauvage et celle complétement. Paa agit donc d'adhérence et la formation des lésions A/E aux cellules intestinales porcines IPEC-J2.

Certaines protéines du SSTT du LEE SepL et SepD influencent à la fois la formation des lésions A/E et la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT, comme Paa. SepL, dont le gène est présent sur le LEE4, est localisée au niveau du cytoplasme bactérien. Elle influence seulement la sécrétion des protéines formant le SSTT et non celle des effecteurs contrairement à Paa qui semble agir sur les deux. Aucune différence dans la transcription du gène *espB* n'a été observée chez la souche mutante *sepL*. SepL n'agit pas au niveau de la transcription des gènes. Cependant, la mise en place du filament EspA chez ce mutant *sepL* est défectueuse. Il serait intéressant de tester par observation directe en microscopie électronique si Paa affecte l'aiguille EspA. La protéine cytoplasmique SepD, dont le gène est présent sur l'opéron LEE2, favorise à la fois la sécrétion des composants du SSTT et la sécrétion des effecteurs. Le mécanisme employé par ces protéines n'est pas encore connu, mais on sait que SepL et SepD interagissent et auraient un rôle dans la hiérarchie de la mise en place du SSTT [226]. Comme SepL et SepD, Paa influence seulement la sécrétion des protéines du SSTT. Il est donc possible que Paa interagisse avec une autre protéine. Une recherche de partenaire de Paa serait intéressante à effectuer par la technique du double hybride par exemple.

2. Influence de Paa sur la sécrétion d'autres protéines chez la souche d'origine porcine ECL1001 et humaine EDL933

La surexpression de Paa chez les souches sauvages ECL1001 et EHEC O157:H7 EDL933 montre une augmentation de la sécrétion de diverses protéines (110 à 15 kDa). Certaines protéines inconnues dont la sécrétion est favorisée par Paa ont été séquencées. On retrouve ainsi une protéine à fonction inconnue Z1479, dont le gène est localisé sur l'îlot OI#45 (CP-933W). Aucune étude n'a été entreprise avec ce facteur absent chez *E. coli* K-12. L'autotransporteur SepA utilisant le système de sécrétion de type V et présent sur le plasmide pTENT2 des souches ETEC a également été séquencé. Ce plasmide porte également le gène *paa* [244]. Au vu de ce résultat de séquençage, il est possible que Paa influence également la sécrétion des autotransporteurs (système de sécrétion de type V) participant à l'adhérence et la colonisation chez les souches AEEC tels que EspC chez les EPEC [172], EspP [174] et Eha [178] chez les EHEC. Paa semblerait donc influencer la sécrétion de protéines indépendantes du SSTT.

Paa peut favoriser à la fois la sécrétion de protéines dépendantes du SSTT (nos résultats) et celui de type II (nos résultats et ceux de Ho et al [257]). L'altération de ces deux systèmes, impliqués dans l'adhérence bactérienne, permet d'expliquer la diminution des lésions A/E observée chez les souches *paa* mutantes dans des modèles *in vitro* et *ex vivo*.

Effets de Paa chez la souche lapine E22

Toutes les expériences réalisées avec la souche d'origine porcine EPEC ECL1001 ont également été effectuées avec la souche d'origine lapine, E22, et ses dérivées (Annexe 1). L'analyse des surnageants de culture indique que Paa a une influence sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT (Annexe 2 et 3). En effet, le mutant *paa* montre une diminution de la sécrétion des protéines du SSTT, comme EspB, comparativement à la souche sauvage. Ces résultats sont comparables avec ceux obtenus avec la souche d'origine porcine. Cependant la complémentation ne semble pas restaurer la sécrétion.

Une analyse transcriptionnelle identique à celle effectuée avec la souche d'origine porcine a été réalisée et indique de manière significative que Paa agit au niveau de la

transcription des gènes du LEE (Annexe 6). Or chez la souche d'origine porcine aucune différence au niveau transcriptionnel n'a été observée.

De plus, une surexpression de Paa chez la souche sauvage E22 entraîne une augmentation de la sécrétion des protéines (Annexe 4). Ces résultats sont également comparables avec ceux obtenus avec la souche d'origine porcine. Cependant cette surexpression de Paa semble inhiber la sécrétion d'EspB (Annexe 5), contrairement à ce qui a pu être observé avec la souche porcine.

Chez la souche d'origine lapine Paa semble donc favoriser la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT en agissant indirectement sur la transcription des gènes du LEE. De plus, une surexpression de Paa entrainerait une inhibition de la sécrétion des protéines du SSTT mais en favoriserait d'autres. Paa agit sur le SSTT chez la souche d'origine lapine et porcine mais par un mécanisme différent. Puisque des différences génétiques et fonctionnelles existent entre les souches AEEC, il est aussi possible que la régulation de leurs facteurs de virulence soit également différente.

CONCLUSION

Les résultats obtenus indiquent que Paa est une protéine périplasmique chez la souche d'origine porcine EPEC ECL1001, conformément aux résultats obtenus avec les souches ETEC et aux prédictions bio-informatiques.

Le mode d'action de Paa est encore inconnu. On sait toutefois qu'elle intervient dans la sécrétion de protéines incluant celles dépendantes du SSTT. Puisque aucune différence significative entre le niveau de production des protéines dépendantes du SSTT et le niveau d'expression de leurs gènes correspondants n'est observée entre les souches PEPEC sauvage et mutante, il semble donc que Paa n'influence pas au niveau transcriptionnel les gènes du LEE. Il est possible que Paa soit impliqué au niveau de la stabilité de la protéine ou au niveau de l'efficacité de la mise en place du SSTT.

L'expérience de sur-expression de Paa dans les souches sauvages PEPEC et EHEC montre une augmentation importante des protéines sécrétées pour les deux pathotypes. Parmi ces protéines, on retrouve les protéines dépendantes du SSTT, mais également d'autres protéines dont une protéine à fonction encore inconnue ECs1223 chez la souche PEPEC. L'effet de Paa sur la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT est proportionnel à son niveau d'expression.

PERSPECTIVES

Rôle de Paa dans la pathogénicité des EPEC

Afin de déterminer si effectivement l'intégrité de la machinerie de sécrétion a été affectée, une expérience de radiomarquage et d'immunoprécipitation utilisant les anticorps dirigés contre EspA, EspB et Tir pourrait être entreprise. De même, les structures du SSTT de bactéries sauvages et *paa* mutantes devraient être observées en microscopie électronique. La présence de structures anormales chez les souches mutantes indiquerait que Paa interfère dans l'assemblage de la machinerie de sécrétion.

Détermination de la régulation de Paa

Si Paa exerce son action via le SSTT, il est possible que sa régulation soit similaire à celle de ce système. Afin de vérifier cette hypothèse, il serait important de mesurer la régulation de *paa* par les facteurs environnementaux (calcium, magnésium, température) agissant sur l'expression du SSTT. Pour cela, l'expression de *paa* dans la souche ECL1001 pourrait être mesurée sous ces divers stimuli par le biais du niveau de β -galactosidase produite à partir d'une fusion *lacZ* avec le promoteur de *paa* et le niveau de transcrits de *paa* par qRT-PCR pourrait aussi être mesuré directement. La production de Paa devait également être évaluée par western blot avec des anticorps spécifiques.

Rôle de Paa dans la pathogénicité des EHEC

Le rôle de Paa dans le développement de lésions A/E chez une souche EHEC serait intéressant à tester et à caractériser à l'aide du modèle d'infection IVOC. À cette fin, un mutant *paa* EHEC O157:H7 EDL933 devrait être créé par échange allélique [2]. Les capacités des souches sauvage, mutée pour *paa* et complémentée à créer des lésions A/E dans le système IVOC d'intestin de porcelet seront comparées. Différentes techniques d'imagerie seront utilisées, dont l'histopathologie et la microscopie confocale à fluorescence, la microscopie électronique à transmission et à balayage afin de caractériser l'interaction entre les bactéries et les cellules de l'hôte [258, 259].

Rôle de Paa dans la pathogénicité des ETEC

Paa est retrouvé chez les ETEC. Pourtant ce pathotype ne forme pas de lésions A/E et ne semble pas posséder le SSTT. Cette constatation surprenante suggère que Paa joue un rôle qui dépasse celui de permettre le fonctionnement efficace du SSTT. Il est possible que Paa exerce une influence non seulement sur le SSTT mais aussi sur d'autres systèmes impliqués dans la virulence tel que le système de sécrétion de type II comme l'a démontré l'équipe de Waldor [257]. Afin de cerner le rôle de Paa dans la virulence, un mutant ETEC pourrait être créé comme pour la souche EHEC et testé en modèle IVOC pour observer une influence possible sur l'adhésion et la sécrétion de toxines.

BIBLIOGRAPHIE

1. Oswald, E., et al., *Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli: characterization of a new intimin variant*. Infect Immun, 2000. **68**(1): p. 64-71.
2. Batisson, I., et al., *Characterization of the novel factor paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing Escherichia coli*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4516-25.
3. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
4. Cantey, J.R. and R.K. Blake, *Diarrhea due to Escherichia coli in the rabbit: a novel mechanism*. J Infect Dis, 1977. **135**(3): p. 454-62.
5. Helie, P., et al., *Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing Escherichia coli O45:K"E65" strain*. Infect Immun, 1991. **59**(3): p. 814-21.
6. Broes, A., et al., *Natural infection with an attaching and effacing Escherichia coli in a diarrheic puppy*. Can J Vet Res, 1988. **52**(2): p. 280-2.
7. Drolet, R., J.M. Fairbrother, and D. Vaillancourt, *Attaching and effacing Escherichia coli in a goat with diarrhea*. Can Vet J, 1994. **35**(2): p. 122-3.
8. Thorpe, C.M., *Shiga toxin-producing Escherichia coli infection*. Clin Infect Dis, 2004. **38**(9): p. 1298-303.
9. Frankel, G., et al., *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli: more subversive elements*. Mol Microbiol, 1998. **30**(5): p. 911-21.
10. McDaniel, T.K., et al., *A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(5): p. 1664-8.
11. An, H., et al., *Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric Escherichia coli*. Adv Exp Med Biol, 1999. **473**: p. 179-84.
12. Leclerc S., P.B., C. Gyles, J.D. Dubreuil, M. Mourez, J.M. Fairbrother, J. Harel, *Paa, originally identified in attaching and effacing E. coli, is also associated with enterotoxigenic E.coli* Research in Microbiology, in press.
13. Donnenberg, M.S. and T.S. Whittam, *Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 539-48.
14. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1453-74.
15. Perna, N.T., et al., *Genome sequence of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Nature, 2001. **409**(6819): p. 529-33.
16. Hayashi, T., et al., *Complete genome sequence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12*. DNA Res, 2001. **8**(1): p. 11-22.
17. Guarner, F., *The intestinal flora in inflammatory bowel disease: normal or abnormal?* Curr Opin Gastroenterol, 2005. **21**(4): p. 414-8.
18. Parsot, C., *Shigella spp. and enteroinvasive Escherichia coli pathogenicity factors*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **252**(1): p. 11-8.
19. Chart, H., et al., *Identification of entero-aggregative Escherichia coli based on surface properties*. J Appl Microbiol, 1997. **83**(6): p. 712-7.
20. Nataro, J.P., *Enteroaggregative Escherichia coli pathogenesis*. Curr Opin Gastroenterol, 2005. **21**(1): p. 4-8.
21. Nataro, J.P., et al., *Patterns of adherence of diarrheagenic Escherichia coli to HEp-2 cells*. Pediatr Infect Dis J, 1987. **6**(9): p. 829-31.

22. Uber, A.P., et al., *Enteroaggregative Escherichia coli from humans and animals differ in major phenotypical traits and virulence genes*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **256**(2): p. 251-7.
23. Laarmann, S. and M.A. Schmidt, *The Escherichia coli AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 7): p. 1871-82.
24. Torres, A.G., X. Zhou, and J.B. Kaper, *Adherence of diarrheagenic Escherichia coli strains to epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(1): p. 18-29.
25. Turner, S.M., et al., *Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer Enterotoxigenic Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **263**(1): p. 10-20.
26. Nagy, B. and P.Z. Fekete, *Enterotoxigenic Escherichia coli (ETEC) in farm animals*. Vet Res, 1999. **30**(2-3): p. 259-84.
27. Elsinghorst, E.A. and J.A. Weitz, *Epithelial cell invasion and adherence directed by the enterotoxigenic Escherichia coli tib locus is associated with a 104-kilodalton outer membrane protein*. Infect Immun, 1994. **62**(8): p. 3463-71.
28. Muniesa, M., et al., *Occurrence of Escherichia coli O157:H7 and other enterohemorrhagic Escherichia coli in the environment*. Environ Sci Technol, 2006. **40**(23): p. 7141-9.
29. Luck, S.N., et al., *Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic Escherichia coli*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 3063-71.
30. Caprioli, A., et al., *Enterohaemorrhagic Escherichia coli: emerging issues on virulence and modes of transmission*. Vet Res, 2005. **36**(3): p. 289-311.
31. Chen, H.D. and G. Frankel, *Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(1): p. 83-98.
32. Ulshen, M.H. and J.L. Rollo, *Pathogenesis of escherichia coli gastroenteritis in man--another mechanism*. N Engl J Med, 1980. **302**(2): p. 99-101.
33. Rothbaum, R.J., R.A. Giannella, and J.C. Partin, *Diarrhea caused by adherent enteropathogenic E. coli*. J Pediatr, 1982. **101**(3): p. 486.
34. Mellies, J.L., A.M. Barron, and A.M. Carmona, *Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli virulence gene regulation*. Infect Immun, 2007. **75**(9): p. 4199-210.
35. Elliott, S.J., et al., *The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic Escherichia coli E2348/69*. Mol Microbiol, 1998. **28**(1): p. 1-4.
36. Zhu, C., et al., *Virulence properties and attaching-effacing activity of Escherichia coli O45 from swine postweaning diarrhea*. Infect Immun, 1994. **62**(10): p. 4153-9.
37. Naylor, S.W., D.L. Gally, and J.C. Low, *Enterohaemorrhagic E. coli in veterinary medicine*. Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7): p. 419-41.
38. Staley, T.E., E.W. Jones, and L.D. Corley, *Attachment and penetration of Escherichia coli into intestinal epithelium of the ileum in newborn pigs*. Am J Pathol, 1969. **56**(3): p. 371-92.
39. Moon, H.W., et al., *Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic Escherichia coli in pig and rabbit intestines*. Infect Immun, 1983. **41**(3): p. 1340-51.
40. Tzipori, S., et al., *The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by Escherichia coli O157:H7 in gnotobiotic piglets*. J Infect Dis, 1986. **154**(4): p. 712-6.

41. Donnenberg, M.S., J.B. Kaper, and B.B. Finlay, *Interactions between enteropathogenic Escherichia coli and host epithelial cells*. Trends Microbiol, 1997. **5**(3): p. 109-14.
42. Dean, P., M. Maresca, and B. Kenny, *EPEC's weapons of mass subversion*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 28-34.
43. Scaletsky, I.C., M.L. Silva, and L.R. Trabulsi, *Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells*. Infect Immun, 1984. **45**(2): p. 534-6.
44. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
45. Stone, K.D., et al., *A cluster of fourteen genes from enteropathogenic Escherichia coli is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus*. Mol Microbiol, 1996. **20**(2): p. 325-37.
46. Spears, K.J., A.J. Roe, and D.L. Gally, *A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli pathogenesis*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **255**(2): p. 187-202.
47. Garmendia, J., G. Frankel, and V.F. Crepin, *Enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli infections: translocation, translocation, translocation*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2573-85.
48. Sanger, J.M., et al., *Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surfaces of infected cells*. Cell Motil Cytoskeleton, 1996. **34**(4): p. 279-87.
49. Hayward, R.D., et al., *Exploiting pathogenic Escherichia coli to model transmembrane receptor signalling*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(5): p. 358-70.
50. Campellone, K.G. and J.M. Leong, *Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic E. coli and enterohemorrhagic E. coli O157:H7*. Curr Opin Microbiol, 2003. **6**(1): p. 82-90.
51. Schuller, S., et al., *Tir phosphorylation and Nck/N-WASP recruitment by enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli during ex vivo colonization of human intestinal mucosa is different to cell culture models*. Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1352-64.
52. Goosney, D.L., S. Gruenheid, and B.B. Finlay, *Gut feelings: enteropathogenic E. coli (EPEC) interactions with the host*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2000. **16**: p. 173-89.
53. Goosney, D.L., R. DeVinney, and B.B. Finlay, *Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli pedestals*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 3315-22.
54. Batchelor, C.L., A.M. Woodward, and D.H. Crouch, *Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import*. Exp Cell Res, 2004. **296**(2): p. 208-22.
55. Cantarelli, V.V., et al., *Cortactin is essential for F-actin assembly in enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)- and enterohaemorrhagic E. coli (EHEC)-induced pedestals and the alpha-helical region is involved in the localization of cortactin to bacterial attachment sites*. Cell Microbiol, 2006. **8**(5): p. 769-80.
56. Weed, S.A. and J.T. Parsons, *Cortactin: coupling membrane dynamics to cortical actin assembly*. Oncogene, 2001. **20**(44): p. 6418-34.
57. Selbach, M. and S. Backert, *Cortactin: an Achilles' heel of the actin cytoskeleton targeted by pathogens*. Trends Microbiol, 2005. **13**(4): p. 181-9.

58. Veiga, E., et al., *Invasive and adherent bacterial pathogens co-Opt host clathrin for infection*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(5): p. 340-51.
59. Ben-Ami, G., et al., *Agents that inhibit Rho, Rac, and Cdc42 do not block formation of actin pedestals in HeLa cells infected with enteropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 1998. **66**(4): p. 1755-8.
60. Brady, M.J., et al., *Enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli Tir proteins trigger a common Nck-independent actin assembly pathway*. Cell Microbiol, 2007. **9**(9): p. 2242-53.
61. Manjarrez-Hernandez, H.A., et al., *Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic Escherichia coli infection*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 2368-70.
62. Guttman, J.A., et al., *Attaching and effacing pathogen-induced tight junction disruption in vivo*. Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 634-45.
63. McNamara, B.P., et al., *Translocated EspF protein from enteropathogenic Escherichia coli disrupts host intestinal barrier function*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 621-9.
64. Viswanathan, V.K., et al., *Cytokeratin 18 interacts with the enteropathogenic Escherichia coli secreted protein F (EspF) and is redistributed after infection*. Cell Microbiol, 2004. **6**(10): p. 987-97.
65. Guttman, J.A., et al., *Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens*. Cell Microbiol, 2006.
66. Silverman, J., et al., *A natural outbreak of transmissible murine colonic hyperplasia in A/J mice*. Lab Anim Sci, 1979. **29**(2): p. 209-13.
67. Luperchio, S.A., et al., *Citrobacter rodentium, the causative agent of transmissible murine colonic hyperplasia, exhibits clonality: synonymy of C. rodentium and mouse-pathogenic Escherichia coli*. J Clin Microbiol, 2000. **38**(12): p. 4343-50.
68. Deng, W., et al., *Locus of enterocyte effacement from Citrobacter rodentium: sequence analysis and evidence for horizontal transfer among attaching and effacing pathogens*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6323-35.
69. Albert, M.J., et al., *Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between enteropathogenic Escherichia coli and Hafnia alvei*. J Med Microbiol, 1992. **37**(5): p. 310-4.
70. Agin, T.S., et al., *Characterization of the eaeA gene from rabbit enteropathogenic Escherichia coli strain RDEC-1 and comparison to other eaeA genes from bacteria that cause attaching-effacing lesions*. FEMS Microbiol Lett, 1996. **144**(2-3): p. 249-58.
71. Hochhut, B., U. Dobrindt, and J. Hacker, *Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival*. Contrib Microbiol, 2005. **12**: p. 234-54.
72. McDaniel, T.K. and J.B. Kaper, *A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12*. Mol Microbiol, 1997. **23**(2): p. 399-407.
73. Elliott, S.J., J. Yu, and J.B. Kaper, *The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon E. coli K-12*. Infect Immun, 1999. **67**(8): p. 4260-3.
74. Jerse, A.E. and J.B. Kaper, *The eae gene of enteropathogenic Escherichia coli encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid*. Infect Immun, 1991. **59**(12): p. 4302-9.
75. Kelly, G., et al., *Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic Escherichia coli*. Nat Struct Biol, 1999. **6**(4): p. 313-8.

76. Touze, T., et al., *Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor*. Mol Microbiol, 2004. **51**(1): p. 73-87.
77. Frankel, G., et al., *Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli, Citrobacter freundii, and Hafnia alvei*. Infect Immun, 1994. **62**(5): p. 1835-42.
78. Adu-Bobie, J., et al., *Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin alpha and intimin beta from enteropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 1998. **66**(12): p. 5643-9.
79. Blanco, M., et al., *Typing of intimin (eae) genes from enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from children with diarrhoea in Montevideo, Uruguay: identification of two novel intimin variants (muB and xiR/beta2B)*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 9): p. 1165-74.
80. Reece, S., et al., *Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity*. Mol Microbiol, 2001. **40**(1): p. 86-98.
81. Frankel, G., et al., *The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic Escherichia coli binds to beta1 integrins*. J Biol Chem, 1996. **271**(34): p. 20359-64.
82. Sinclair, J.F. and A.D. O'Brien, *Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. J Biol Chem, 2002. **277**(4): p. 2876-85.
83. Sinclair, J.F. and A.D. O'Brien, *Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor*. J Biol Chem, 2004. **279**(32): p. 33751-8.
84. Sinclair, J.F., E.A. Dean-Nystrom, and A.D. O'Brien, *The established intimin receptor Tir and the putative eucaryotic intimin receptors nucleolin and beta1 integrin localize at or near the site of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 adherence to enterocytes in vivo*. Infect Immun, 2006. **74**(2): p. 1255-65.
85. Dean, P. and B. Kenny, *Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic Escherichia coli is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein*. Mol Microbiol, 2004. **54**(3): p. 665-75.
86. Coburn, B., I. Sekirov, and B.B. Finlay, *Type III secretion systems and disease*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 535-49.
87. Jarvis, K.G., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(17): p. 7996-8000.
88. Lloyd, S.A., et al., *Molecular characterization of type III secretion signals via analysis of synthetic N-terminal amino acid sequences*. Mol Microbiol, 2002. **43**(1): p. 51-9.
89. Creasey, E.A., et al., *Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE-encoded proteins of enteropathogenic Escherichia coli*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 8): p. 2093-106.
90. Crepin, V.F., et al., *Structural and functional studies of the enteropathogenic Escherichia coli type III needle complex protein EscJ*. Mol Microbiol, 2005. **55**(6): p. 1658-70.
91. Gauthier, A., J.L. Puente, and B.B. Finlay, *Secretin of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system requires components of the type III apparatus for assembly and localization*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3310-9.

92. Sekiya, K., et al., *Supermolecular structure of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(20): p. 11638-43.
93. Knutton, S., et al., *A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic Escherichia coli involved in protein translocation into epithelial cells*. Embo J, 1998. **17**(8): p. 2166-76.
94. Daniell, S.J., et al., *Coiled-coil domain of enteropathogenic Escherichia coli type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis*. Infect Immun, 2001. **69**(6): p. 4055-64.
95. Crepin, V.F., et al., *Polarity of enteropathogenic Escherichia coli EspA filament assembly and protein secretion*. J Bacteriol, 2005. **187**(8): p. 2881-9.
96. Pallen, M.J., S.A. Beatson, and C.M. Bailey, *Bioinformatics analysis of the locus for enterocyte effacement provides novel insights into type-III secretion*. BMC Microbiol, 2005. **5**(1): p. 9.
97. Singh, M.P., et al., *Identification of amino acid residues within the N-terminal domain of EspA that play a role in EspA filament biogenesis and function*. J Bacteriol, 2008. **190**(6): p. 2221-6.
98. Kato, T., et al., *A pH-dependent conformational change in EspA, a component of the Escherichia coli O157:H7 type III secretion system*. Febs J, 2005. **272**(11): p. 2773-83.
99. Moreira, C.G., et al., *Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(11): p. 3952-61.
100. Daniell, S.J., et al., *The filamentous type III secretion translocon of enteropathogenic Escherichia coli*. Cell Microbiol, 2001. **3**(12): p. 865-71.
101. Ide, T., et al., *Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic Escherichia coli*. Cell Microbiol, 2001. **3**(10): p. 669-79.
102. Taylor, K.A., P.W. Luther, and M.S. Donnenberg, *Expression of the EspB protein of enteropathogenic Escherichia coli within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology*. Infect Immun, 1999. **67**(1): p. 120-5.
103. Hartland, E.L., et al., *The type III protein translocation system of enteropathogenic Escherichia coli involves EspA-EspB protein interactions*. Mol Microbiol, 2000. **35**(6): p. 1483-92.
104. Kodama, T., et al., *The EspB protein of enterohaemorrhagic Escherichia coli interacts directly with alpha-catenin*. Cell Microbiol, 2002. **4**(4): p. 213-22.
105. Knappstein, S., et al., *Alpha 1-antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic Escherichia coli strains*. Infect Immun, 2004. **72**(8): p. 4344-50.
106. Chiu, H.J. and W.J. Syu, *Functional analysis of EspB from enterohaemorrhagic Escherichia coli*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 10): p. 3277-86.
107. Clarke, S.C., et al., *Virulence of enteropathogenic Escherichia coli, a global pathogen*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 365-78.
108. Iizumi, Y., et al., *The enteropathogenic E. coli effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 383-92.
109. Wachter, C., et al., *Insertion of EspD into epithelial target cell membranes by infecting enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1999. **31**(6): p. 1695-707.

110. Wilson, R.K., et al., *Role of EscF, a putative needle complex protein, in the type III protein translocation system of enteropathogenic Escherichia coli*. Cell Microbiol, 2001. **3**(11): p. 753-62.
111. Kresse, A.U., M. Rohde, and C.A. Guzman, *The EspD protein of enterohemorrhagic Escherichia coli is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells*. Infect Immun, 1999. **67**(9): p. 4834-42.
112. Andrade, A., et al., *Enzymatic characterization of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion ATPase EscN*. Arch Biochem Biophys, 2007. **468**(1): p. 121-7.
113. Rosenshine, I., et al., *Signal transduction between enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake*. Embo J, 1992. **11**(10): p. 3551-60.
114. Kenny, B., et al., *Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells*. Cell, 1997. **91**(4): p. 511-20.
115. DeVinney, R., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli: a pathogen that inserts its own receptor into host cells*. Cell Mol Life Sci, 1999. **55**(6-7): p. 961-76.
116. Kenny, B., *The enterohaemorrhagic Escherichia coli (serotype O157:H7) Tir molecule is not functionally interchangeable for its enteropathogenic E. coli (serotype O127:H6) homologue*. Cell Microbiol, 2001. **3**(8): p. 499-510.
117. Campellone, K.G. and J.M. Leong, *Nck-independent actin assembly is mediated by two phosphorylated tyrosines within enteropathogenic Escherichia coli Tir*. Mol Microbiol, 2005. **56**(2): p. 416-32.
118. Phillips, N., R.D. Hayward, and V. Koronakis, *Phosphorylation of the enteropathogenic E. coli receptor by the Src-family kinase c-Fyn triggers actin pedestal formation*. Nat Cell Biol, 2004. **6**(7): p. 618-25.
119. Swimm, A., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli use redundant tyrosine kinases to form actin pedestals*. Mol Biol Cell, 2004. **15**(8): p. 3520-9.
120. Campellone, K.G., et al., *A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic Escherichia coli Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals*. Mol Microbiol, 2002. **43**(5): p. 1227-41.
121. Gruenheid, S., et al., *Enteropathogenic E. coli Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(9): p. 856-9.
122. DeVinney, R., et al., *Enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli use a different Tir-based mechanism for pedestal formation*. Mol Microbiol, 2001. **41**(6): p. 1445-58.
123. Campellone, K.G., D. Robbins, and J.M. Leong, *EspFU is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly*. Dev Cell, 2004. **7**(2): p. 217-28.
124. Campellone, K.G., et al., *Enterohaemorrhagic Escherichia coli Tir requires a C-terminal 12-residue peptide to initiate EspF-mediated actin assembly and harbours N-terminal sequences that influence pedestal length*. Cell Microbiol, 2006. **8**(9): p. 1488-503.
125. Frankel, G. and A.D. Phillips, *Attaching effacing Escherichia coli and paradigms of Tir-triggered actin polymerization: getting off the pedestal*. Cell Microbiol, 2008. **10**(3): p. 549-56.

126. Shaw, R.K., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli* type III effectors *EspG* and *EspG2* disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells. *Infect Immun*, 2005. **73**(7): p. 4385-90.
127. Hardwidge, P.R., et al., *Modulation of host cytoskeleton function by the enteropathogenic Escherichia coli and Citrobacter rodentium effector protein EspG*. *Infect Immun*, 2005. **73**(5): p. 2586-94.
128. Matsuzawa, T., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli* activates the *RhoA* signaling pathway via the stimulation of *GEF-H1*. *Embo J*, 2004. **23**(17): p. 3570-82.
129. Gill, R.K., et al., *Function, expression, and characterization of the serotonin transporter in the native human intestine*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2008. **294**(1): p. G254-62.
130. Guttman, J.A., et al., *Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens*. *Cell Microbiol*, 2007. **9**(1): p. 131-41.
131. Kenny, B., et al., *Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic Escherichia coli effector molecules*. *Mol Microbiol*, 2002. **44**(4): p. 1095-1107.
132. Tu, X., et al., *EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 2003. **47**(3): p. 595-606.
133. Kenny, B. and M. Jepson, *Targeting of an enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) effector protein to host mitochondria*. *Cell Microbiol*, 2000. **2**(6): p. 579-90.
134. Morales, F.C., et al., *Ezrin-radixin-moesin (ERM)-binding phosphoprotein 50 organizes ERM proteins at the apical membrane of polarized epithelia*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(51): p. 17705-10.
135. Bretscher, A., et al., *ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2000. **16**: p. 113-43.
136. Simpson, N., et al., *The enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system effector Map binds EBP50/NHERF1: implication for cell signalling and diarrhoea*. *Mol Microbiol*, 2006. **60**(2): p. 349-63.
137. Nougayrede, J.P. and M.S. Donnenberg, *Enteropathogenic Escherichia coli EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway*. *Cell Microbiol*, 2004. **6**(11): p. 1097-111.
138. McNamara, B.P. and M.S. Donnenberg, *A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic Escherichia coli via the type III export pathway*. *FEMS Microbiol Lett*, 1998. **166**(1): p. 71-8.
139. Nagai, T., A. Abe, and C. Sasakawa, *Targeting of enteropathogenic Escherichia coli EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(4): p. 2998-3011.
140. Crane, J.K., B.P. McNamara, and M.S. Donnenberg, *Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 2001. **3**(4): p. 197-211.
141. Nougayrede, J.P., G.H. Foster, and M.S. Donnenberg, *Enteropathogenic Escherichia coli effector EspF interacts with host protein Abcf2*. *Cell Microbiol*, 2007. **9**(3): p. 680-93.
142. Viswanathan, V.K., et al., *Comparative analysis of EspF from enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli in alteration of epithelial barrier function*. *Infect Immun*, 2004. **72**(6): p. 3218-27.

143. Deng, W., et al., *Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3597-602.
144. Tomson, F.L., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier*. Mol Microbiol, 2005. **56**(2): p. 447-64.
145. Badour, K., et al., *Interaction of the Wiskott-Aldrich syndrome protein with sorting nexin 9 is required for CD28 endocytosis and cosignaling in T cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(5): p. 1593-8.
146. Marches, O., et al., *EspF of enteropathogenic Escherichia coli binds sorting nexin 9*. J Bacteriol, 2006. **188**(8): p. 3110-5.
147. Alto, N.M., et al., *The type III effector EspF coordinates membrane trafficking by the spatiotemporal activation of two eukaryotic signaling pathways*. J Cell Biol, 2007. **178**(7): p. 1265-78.
148. Yarar, D., C.M. Waterman-Storer, and S.L. Schmid, *SNX9 couples actin assembly to phosphoinositide signals and is required for membrane remodeling during endocytosis*. Dev Cell, 2007. **13**(1): p. 43-56.
149. Kanack, K.J., et al., *SepZ/EspZ is secreted and translocated into HeLa cells by the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4327-37.
150. Wainwright, L.A. and J.B. Kaper, *EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1998. **27**(6): p. 1247-60.
151. Neves, B.C., et al., *CesD2 of enteropathogenic Escherichia coli is a second chaperone for the type III secretion translocator protein EspD*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 2130-41.
152. Creasey, E.A., et al., *CesT is a bivalent enteropathogenic Escherichia coli chaperone required for translocation of both Tir and Map*. Mol Microbiol, 2003. **47**(1): p. 209-21.
153. Delahay, R.M., et al., *Functional analysis of the enteropathogenic Escherichia coli type III secretion system chaperone CesT identifies domains that mediate substrate interactions*. Mol Microbiol, 2002. **43**(1): p. 61-73.
154. Elliott, S.J., et al., *A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic Escherichia coli to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2271-7.
155. Creasey, E.A., et al., *CesAB is an enteropathogenic Escherichia coli chaperone for the type-III translocator proteins EspA and EspB*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 12): p. 3639-47.
156. Su, M.S., et al., *Gene 10017 encodes a second chaperone for EspA of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157 : H7*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 4): p. 1094-103.
157. Thomas, N.A., et al., *CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2005. **57**(6): p. 1762-79.
158. Thomas, N.A., et al., *Hierarchical delivery of an essential host colonization factor in enteropathogenic Escherichia coli*. J Biol Chem, 2007. **282**(40): p. 29634-45.
159. Giron, J.A., A.S. Ho, and G.K. Schoolnik, *Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 1993. **175**(22): p. 7391-403.

160. Ramboarina, S., et al., *Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic Escherichia coli*. J Biol Chem, 2005. **280**(48): p. 40252-60.
161. Hwang, J., et al., *Structural and topographical studies of the type IV bundle-forming pilus assembly complex of enteropathogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2003. **185**(22): p. 6695-701.
162. Bieber, D., et al., *Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic Escherichia coli*. Science, 1998. **280**(5372): p. 2114-8.
163. Cleary, J., et al., *Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 3): p. 527-38.
164. Nougayrede, J.P., P.J. Fernandes, and M.S. Sonnenberg, *Adhesion of enteropathogenic Escherichia coli to host cells*. Cell Microbiol, 2003. **5**(6): p. 359-72.
165. Hyland, R.M., et al., *Basis for N-acetyllactosamine-mediated inhibition of enteropathogenic Escherichia coli localized adherence*. J Med Microbiol, 2006. **55**(Pt 6): p. 669-75.
166. Lathem, W.W., et al., *StcE, a metalloprotease secreted by Escherichia coli O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor*. Mol Microbiol, 2002. **45**(2): p. 277-88.
167. Gryns, T.E., L.L. Walters, and R.A. Welch, *Characterization of the StcE protease activity of Escherichia coli O157:H7*. J Bacteriol, 2006. **188**(13): p. 4646-53.
168. Gryns, T.E., et al., *The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 to host cells*. Infect Immun, 2005. **73**(3): p. 1295-303.
169. Stein, M., et al., *Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic Escherichia coli which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins*. J Bacteriol, 1996. **178**(22): p. 6546-54.
170. Mellies, J.L., et al., *espC pathogenicity island of enteropathogenic Escherichia coli encodes an enterotoxin*. Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 315-24.
171. Navarro-Garcia, F., et al., *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, 2004. **72**(6): p. 3609-21.
172. Drago-Serrano, M.E., S.G. Parra, and H.A. Manjarrez-Hernandez, *EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **265**(1): p. 35-40.
173. Brockmeyer, J., et al., *Subtypes of the plasmid-encoded serine protease EspP in Shiga toxin-producing Escherichia coli: distribution, secretion, and proteolytic activity*. Appl Environ Microbiol, 2007. **73**(20): p. 6351-9.
174. Dziva, F., et al., *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, 2007. **271**(2): p. 258-64.
175. Brunder, W., H. Schmidt, and H. Karch, *EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 cleaves human coagulation factor V*. Mol Microbiol, 1997. **24**(4): p. 767-78.
176. Djafari, S., et al., *Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1997. **25**(4): p. 771-84.

177. Dutta, P.R., et al., *Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae*. Infect Immun, 2002. **70**(12): p. 7105-13.
178. Wells, T.J., et al., *EhaA is a novel autotransporter protein of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 that contributes to adhesion and biofilm formation*. Environ Microbiol, 2008. **10**(3): p. 589-604.
179. Klapproth, J.M., et al., *A large toxin from pathogenic Escherichia coli strains that inhibits lymphocyte activation*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 2148-55.
180. Badea, L., et al., *Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic Escherichia coli to epithelial cells*. Microb Pathog, 2003. **34**(5): p. 205-15.
181. Nicholls, L., T.H. Grant, and R.M. Robins-Browne, *Identification of a novel genetic locus that is required for in vitro adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic Escherichia coli to epithelial cells*. Mol Microbiol, 2000. **35**(2): p. 275-88.
182. Stevens, M.P., et al., *Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing Escherichia coli serotypes O5 and O111*. Infect Immun, 2002. **70**(9): p. 5158-66.
183. Tatsuno, I., et al., *tox B gene on pO157 of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype*. Infect Immun, 2001. **69**(11): p. 6660-9.
184. Charpentier, X. and E. Oswald, *Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter*. J Bacteriol, 2004. **186**(16): p. 5486-95.
185. Taieb, F., et al., *Escherichia coli cyclomodulin Cif induces G2 arrest of the host cell cycle without activation of the DNA-damage checkpoint-signalling pathway*. Cell Microbiol, 2006. **8**(12): p. 1910-21.
186. Marches, O., et al., *Enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition*. Mol Microbiol, 2003. **50**(5): p. 1553-67.
187. Garmendia, J. and G. Frankel, *Operon structure and gene expression of the espJ-tccP locus of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. FEMS Microbiol Lett, 2005. **247**(2): p. 137-45.
188. Dahan, S., et al., *EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics*. Infect Immun, 2005. **73**(2): p. 679-86.
189. Marches, O., et al., *EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli inhibits opsono-phagocytosis*. Cell Microbiol, 2008. **10**(5): p. 1104-15.
190. Garmendia, J., et al., *Distribution of tccP in clinical enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli isolates*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(11): p. 5715-20.
191. Garmendia, J., et al., *TccP is an enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton*. Cell Microbiol, 2004. **6**(12): p. 1167-83.
192. Cantarelli, V.V., et al., *Tyrosine phosphorylation controls cortactin binding to two enterohaemorrhagic Escherichia coli effectors: Tir and EspFu/TccP*. Cell Microbiol, 2007. **9**(7): p. 1782-95.
193. Ritchie, J.M., et al., *EspFU, a type III-translocated effector of actin assembly, fosters epithelial association and late-stage intestinal colonization by E. coli O157:H7*. Cell Microbiol, 2008. **10**(4): p. 836-47.

194. Ogura, Y., et al., *TccP2 of O157:H7 and non-O157 enterohemorrhagic Escherichia coli (EHEC): challenging the dogma of EHEC-induced actin polymerization*. Infect Immun, 2007. **75**(2): p. 604-12.
195. Whale, A.D., et al., *TccP2-mediated subversion of actin dynamics by EPEC 2 - a distinct evolutionary lineage of enteropathogenic Escherichia coli*. Microbiology, 2007. **153**(Pt 6): p. 1743-55.
196. Vlisidou, I., et al., *Identification and characterization of EspK, a type III secreted effector protein of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **263**(1): p. 32-40.
197. Arbeloa, A., et al., *Subversion of actin dynamics by EspM effectors of attaching and effacing bacterial pathogens*. Cell Microbiol, 2008.
198. Gruenheid, S., et al., *Identification and characterization of NleA, a non-LEE-encoded type III translocated virulence factor of enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7*. Mol Microbiol, 2004. **51**(5): p. 1233-49.
199. Creuzburg, K. and H. Schmidt, *Molecular characterization and distribution of genes encoding members of the type III effector nleA family among pathogenic Escherichia coli strains*. J Clin Microbiol, 2007. **45**(8): p. 2498-507.
200. Kim, J., et al., *The bacterial virulence factor NleA inhibits cellular protein secretion by disrupting mammalian COPII function*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(3): p. 160-71.
201. Lee, S.F., et al., *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, 2008. **10**(2): p. 499-513.
202. Marches, O., et al., *Characterization of two non-locus of enterocyte effacement-encoded type III-translocated effectors, NleC and NleD, in attaching and effacing pathogens*. Infect Immun, 2005. **73**(12): p. 8411-7.
203. Garcia-Angulo, V.A., et al., *Regulation of expression and secretion of NleH, a new non-locus of enterocyte effacement-encoded effector in Citrobacter rodentium*. J Bacteriol, 2008. **190**(7): p. 2388-99.
204. Kelly, M., et al., *Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by Citrobacter rodentium*. Infect Immun, 2006. **74**(4): p. 2328-37.
205. Echtenkamp, F., et al., *Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens*. FEMS Microbiol Lett, 2008.
206. Wickham, M.E., et al., *Citrobacter rodentium virulence in mice associates with bacterial load and the type III effector NleE*. Microbes Infect, 2007. **9**(3): p. 400-7.
207. Zurawski, D.V., et al., *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, 2008. **76**(1): p. 369-79.
208. Li, M., et al., *Identification and characterization of NleI, a new non-LEE-encoded effector of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)*. Microbes Infect, 2006. **8**(14-15): p. 2890-8.
209. Tobe, T., et al., *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, 2006. **103**(40): p. 14941-6.
210. Elliott, S.J., et al., *The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in*

- enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*. Infect Immun, 2000. **68**(11): p. 6115-26.
211. Haack, K.R., et al., *Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 384-92.
 212. Li, M., et al., *Comparative proteomic analysis of extracellular proteins of enterohemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli strains and their ihf and ler mutants*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(9): p. 5274-82.
 213. Mellies, J.L., et al., *The Per regulon of enteropathogenic Escherichia coli: identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)*. Mol Microbiol, 1999. **33**(2): p. 296-306.
 214. Sperandio, V., et al., *Activation of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler*. Mol Microbiol, 2000. **38**(4): p. 781-93.
 215. Leverton, L.Q. and J.B. Kaper, *Temporal expression of enteropathogenic Escherichia coli virulence genes in an in vitro model of infection*. Infect Immun, 2005. **73**(2): p. 1034-43.
 216. Berdichevsky, T., et al., *Ler is a negative autoregulator of the LEE1 operon in enteropathogenic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2005. **187**(1): p. 349-57.
 217. Gomez-Duarte, O.G. and J.B. Kaper, *A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal eaeA expression in enteropathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 1995. **63**(5): p. 1767-76.
 218. Tobe, T., et al., *Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1996. **21**(5): p. 963-75.
 219. Porter, M.E., et al., *The LEE1 promoters from both enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli can be activated by PerC-like proteins from either organism*. J Bacteriol, 2005. **187**(2): p. 458-72.
 220. Iyoda, S. and H. Watanabe, *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, 2004. **150**(Pt 7): p. 2357-571.
 221. Laaberki, M.H., et al., *Concert of regulators to switch on LEE expression in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7: Interplay between Ler, GrlA, HNS and RpoS*. Int J Med Microbiol, 2006. **296**(4-5): p. 197-210.
 222. Huang, L.H. and W.J. Syu, *GrlA of enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 activates LEE1 by binding to the promoter region*. J Microbiol Immunol Infect, 2008. **41**(1): p. 9-16.
 223. Barba, J., et al., *A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA*. J Bacteriol, 2005. **187**(23): p. 7918-30.
 224. Iyoda, S., et al., *The GrlR-GrlA regulatory system coordinately controls the expression of flagellar and LEE-encoded type III protein secretion systems in enterohemorrhagic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2006. **188**(16): p. 5682-92.
 225. Russell, R.M., et al., *QseA and GrlR/GrlA regulation of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic Escherichia coli*. J Bacteriol, 2007. **189**(14): p. 5387-92.
 226. O'Connell, C.B., et al., *SepL, a protein required for enteropathogenic Escherichia coli type III translocation, interacts with secretion component SepD*. Mol Microbiol, 2004. **52**(6): p. 1613-25.

227. Bustamante, V.H., et al., *Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic Escherichia coli: Ler antagonizes H-NS-dependent repression.* Mol Microbiol, 2001. **39**(3): p. 664-78.
228. Bertin, P., et al., *The H-NS protein is involved in the biogenesis of flagella in Escherichia coli.* J Bacteriol, 1994. **176**(17): p. 5537-40.
229. Stewart, N., et al., *Loss of topoisomerase I function affects the RpoS-dependent and GAD systems of acid resistance in Escherichia coli.* Microbiology, 2005. **151**(Pt 8): p. 2783-91.
230. Giangrossi, M., et al., *Antagonistic role of H-NS and GadX in the regulation of the glutamate decarboxylase-dependent acid resistance system in Escherichia coli.* J Biol Chem, 2005. **280**(22): p. 21498-505.
231. Shin, S., et al., *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, 2001. **41**(5): p. 1133-50.
232. Puente, J.L., et al., *The bundle-forming pili of enteropathogenic Escherichia coli: transcriptional regulation by environmental signals.* Mol Microbiol, 1996. **20**(1): p. 87-100.
233. Rosenshine, I., S. Ruschkowski, and B.B. Finlay, *Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic Escherichia coli depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells.* Infect Immun, 1996. **64**(3): p. 966-73.
234. Yoh, M., et al., *Effect of environmental conditions on proteins secreted by enterohemorrhagic Escherichia coli O26:H11.* Microbiol Immunol, 2003. **47**(1): p. 1-6.
235. Abe, H., et al., *Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7.* Infect Immun, 2002. **70**(7): p. 3500-9.
236. Michgehl, S., et al., *Esp-independent functional integration of the translocated intimin receptor (Tir) of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) into host cell membranes.* Cell Microbiol, 2006. **8**(4): p. 625-33.
237. Ide, T., et al., *Differential modulation by Ca²⁺ of type III secretion of diffusely adhering enteropathogenic Escherichia coli.* Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1725-32.
238. Deng, W., et al., *Regulation of type III secretion hierarchy of translocators and effectors in attaching and effacing bacterial pathogens.* Infect Immun, 2005. **73**(4): p. 2135-46.
239. Sircili, M.P., et al., *Modulation of enteropathogenic Escherichia coli virulence by quorum sensing.* Infect Immun, 2004. **72**(4): p. 2329-37.
240. Sharp, F.C. and V. Sperandio, *QseA directly activates transcription of LEE1 in enterohemorrhagic Escherichia coli.* Infect Immun, 2007. **75**(5): p. 2432-40.
241. Sperandio, V., C.C. Li, and J.B. Kaper, *Quorum-sensing Escherichia coli regulator A: a regulator of the LysR family involved in the regulation of the locus of enterocyte effacement pathogenicity island in enterohemorrhagic E. coli.* Infect Immun, 2002. **70**(6): p. 3085-93.
242. Clarke, M.B. and V. Sperandio, *Transcriptional regulation of flhDC by QseBC and sigma (FliA) in enterohaemorrhagic Escherichia coli.* Mol Microbiol, 2005. **57**(6): p. 1734-49.

243. Reading, N.C., et al., *A novel two-component signaling system that activates transcription of an enterohemorrhagic Escherichia coli effector involved in remodeling of host actin*. J Bacteriol, 2007. **189**(6): p. 2468-76.
244. Leclerc, S., et al., *paa, originally identified in attaching and effacing Escherichia coli, is also associated with enterotoxigenic E. coli*. Res Microbiol, 2007. **158**(1): p. 97-104.
245. Hughes, K.J., et al., *Isolation and characterization of the Vibrio cholerae acfA gene, required for efficient intestinal colonization*. Gene, 1995. **156**(1): p. 59-61.
246. Everiss, K.D., K.J. Hughes, and K.M. Peterson, *The accessory colonization factor and toxin-coregulated pilus gene clusters are physically linked on the Vibrio cholerae 0395 chromosome*. DNA Seq, 1994. **5**(1): p. 51-5.
247. Pei, Z.H., R.T. Ellison, 3rd, and M.J. Blaser, *Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of Campylobacter jejuni*. J Biol Chem, 1991. **266**(25): p. 16363-9.
248. Linton, D., et al., *Identification of N-acetylgalactosamine-containing glycoproteins PEB3 and CgpA in Campylobacter jejuni*. Mol Microbiol, 2002. **43**(2): p. 497-508.
249. Rangarajan, E.S., et al., *Structure and active site residues of PglD, an N-acetyltransferase from the bacillosamine synthetic pathway required for N-glycan synthesis in Campylobacter jejuni*. Biochemistry, 2008. **47**(7): p. 1827-36.
250. Rangarajan, E.S., et al., *Structural context for protein N-glycosylation in bacteria: The structure of PEB3, an adhesin from Campylobacter jejuni*. Protein Sci, 2007. **16**(5): p. 990-5.
251. Parkhill, J., et al., *The genome sequence of the food-borne pathogen Campylobacter jejuni reveals hypervariable sequences*. Nature, 2000. **403**(6770): p. 665-8.
252. An, H., et al., *Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing Escherichia coli and characterization of eae, espA, espB and espD genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390*. Microb Pathog, 2000. **28**(5): p. 291-300.
253. Camguilhem, R. and A. Milon, *Biotypes and O serogroups of Escherichia coli involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains*. J Clin Microbiol, 1989. **27**(4): p. 743-7.
254. Zhu, C., et al., *Complete nucleotide sequence and analysis of the locus of enterocyte Effacement from rabbit diarrheagenic Escherichia coli RDEC-1*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2107-15.
255. Takeuchi, A., et al., *Scanning and transmission electron microscopic study of Escherichia coli O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits*. Infect Immun, 1978. **19**(2): p. 686-94.
256. Bergholz, T.M., et al., *Global transcriptional response of Escherichia coli O157:H7 to growth transitions in glucose minimal medium*. BMC Microbiol, 2007. **7**: p. 97.
257. Ho, T.D., et al., *Type 2 secretion promotes enterohemorrhagic Escherichia coli adherence and intestinal colonization*. Infect Immun, 2008. **76**(5): p. 1858-65.
258. Zhu, C., et al., *Interaction with pig ileal explants of Escherichia coli O45 isolates from swine with postweaning diarrhea*. Can J Vet Res, 1995. **59**(2): p. 118-23.
259. Girard, F., et al., *Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing Escherichia coli and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence*. Infect Immun, 2005. **73**(9): p. 6005-16.

ANNEXES

Annexe 1

Les expériences réalisées avec la souche d'origine porcine EPEC ECL1001 ont été également effectuées avec la souche lapine REPEC E22. Les souches utilisées sont décrits dans la TABLE 1.

TABLE 1: Strains and plasmid used in this study

| Bacterial strains or plasmid | Relevant characteristics | Reference or source |
|--|---|---------------------|
| Bacterial strains : | | |
| E22 | REPEC O103:H2 paa+ | [1] |
| E22 pTrc99a:: <i>paa</i> | E22 pTrc99a:: <i>paa</i> | This study |
| E22 Δ <i>paa</i> | E22 <i>paa</i> :: <i>kan</i> | [2] |
| E22 Δ <i>paa</i> pTrc99a:: <i>paa</i> | E22 Δ <i>paa</i> pTrc99a:: <i>paa</i> | This study |
| E22 Δ <i>paa</i> FGC | E22 Δ <i>paa</i> pACYC184:: <i>paa</i> | [2] |
| E22 Δ <i>escN</i> | E22 Δ <i>escN</i> :: <i>kan</i> | [1] |
| Plasmid | | |
| pTrc99a | Double strand-DNA 4176 | Pharmacia Biotech |

Annexe 2

Pour vérifier l'influence de Paa sur la sécrétion des protéines, l'analyse du surnageant de la souche sauvage E22, mutante E22 Δ paa, complétée E22 Δ paaFGC ainsi que la souche E22 Δ escN a été réalisée.

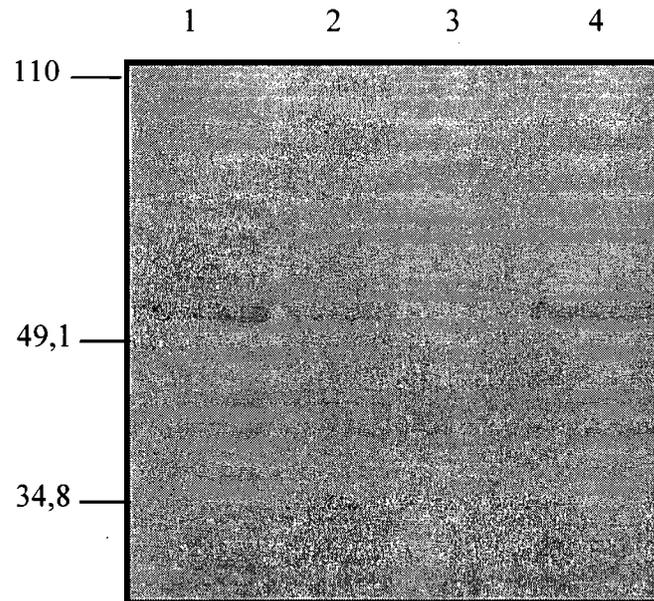


FIGURE 1. The presence of Paa is important for efficient type III effector secretion
Coomasie blue stained of the SDS-PAGE of secreted proteins. Lane 1, E22; Lane 2, E22 Δ paa; Lane 3, E22 Δ paaFGC; Lane 4, E22 Δ escN

On observe que la sécrétion semble être affectée chez la souche mutante E22 Δ paa comparativement à la souche sauvage E22. Cependant il y a moins de sécrétion chez la souche complétée. Puisque la complémentation a été faite avec un plasmide pACYC184 à nombre de copies moyen, il est possible que la quantité de Paa produite soit responsable de l'inhibition de la sécrétion chez la souche complétée. Cette observation est différente de ce qui est constaté avec la souche complétée porcine M155c pour laquelle la sécrétion de protéines est augmentée par rapport à la souche mutante. La souche E22 Δ escN, mutée au niveau de l'ATPase, permet une inactivation de la sécrétion des protéines dépendante du SSTT et sert de contrôle.

Annexe 3

Suite aux résultats obtenus en bleu de comassie un western blot anti-EspB a été réalisé, pour vérifier le niveau de sécrétion de cette protéine effectrice.

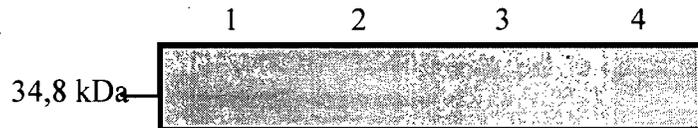


FIGURE 2. Western blot anti-EspB on secreted proteins for TTSS-dependant secreted proteins of E22 strain and derivatives. Lane 1, E22; Lane 2, E22 Δ paa; Lane 3, E22 Δ paaFGC; Lane 4, E22 Δ escN

La sécrétion d'EspB n'est pas observée chez la souche mutante E22 Δ paa et chez la souche complémentée E22 Δ paaFGC. La réduction de la sécrétion d'EspB chez la souche mutante E22 Δ paa est aussi observée chez la souche d'origine porcine mutante M155. Cependant contrairement à ce qui est observée avec la souche d'origine porcine mutante complémentée, la sécrétion d'EspB n'est pas observée avec la souche complémentée E22 Δ paaFGC.

Annexe 4

La transformation de la souche sauvage E22 avec le plasmide pTrc99a::*paa* a été réalisée. L'analyse du surnageant de la souche sauvage surexprimant Paa a été effectuée.

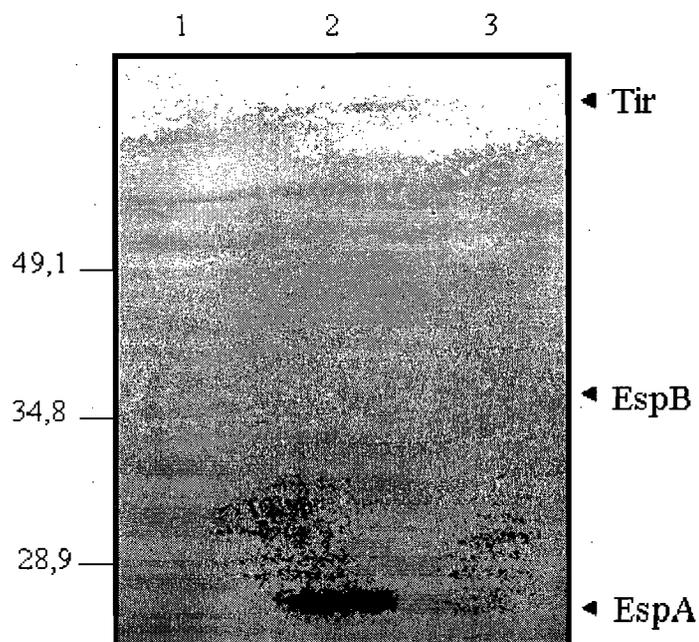


FIGURE 3. The presence of Paa is important for efficient type III effector secretion
Coomassie blue stained of the SDS-PAGE of secreted proteins. Lane 1, E22; Lane 2, E22pTrc99a::*paa*; Lane 3, E22Δ*paa*

Comme pour les souches ECL1001 et EDL933 portant le plasmide pTrc99a::*paa*, on observe une augmentation de la sécrétion des protéines.

Annexe 5

Pour vérifier que la sécrétion d'EspB de la souche E22pTrc99a::*paa* est augmentée, un western anti-EspB a été réalisé.

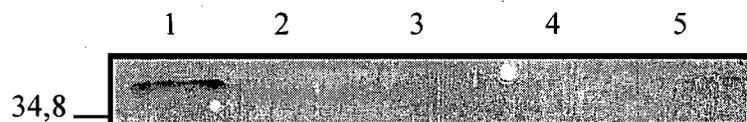


FIGURE 4. Western blot anti-EspB on secreted proteins for TTSS-dependant secreted proteins of all strains. Lane 1, E22; Lane 2, E22pTrc99a::*paa*; Lane 4, E22Δ*paa*; Lane 5, E22Δ*paa* pTrc99a::*paa*.

L'inhibition de la sécrétion d'EspB est observée chez la souche mutée E22Δ*paa*, mais également chez la souche sauvage surexprimant Paa. Par contre une faible complémentation est observée avec la souche E22Δ*paa*pTrc99a::*paa*. Alors que la sécrétion n'était pas observée chez E22Δ*paa* complétementée par le plasmide pACYC184::*paa*.

Annexe 6

On observe une diminution de la sécrétion des protéines dépendantes du SSTT chez le mutant *paa* et une diminution du niveau de production des protéines correspondantes (maîtrise de Sébastien Leclerc). Paa influence donc la sécrétion et la production des protéines dépendantes du SSTT chez la souche lapine. Pour vérifier si Paa agit indirectement au niveau de la transcription de ces gènes, une RT-PCR quantitative a été réalisée.

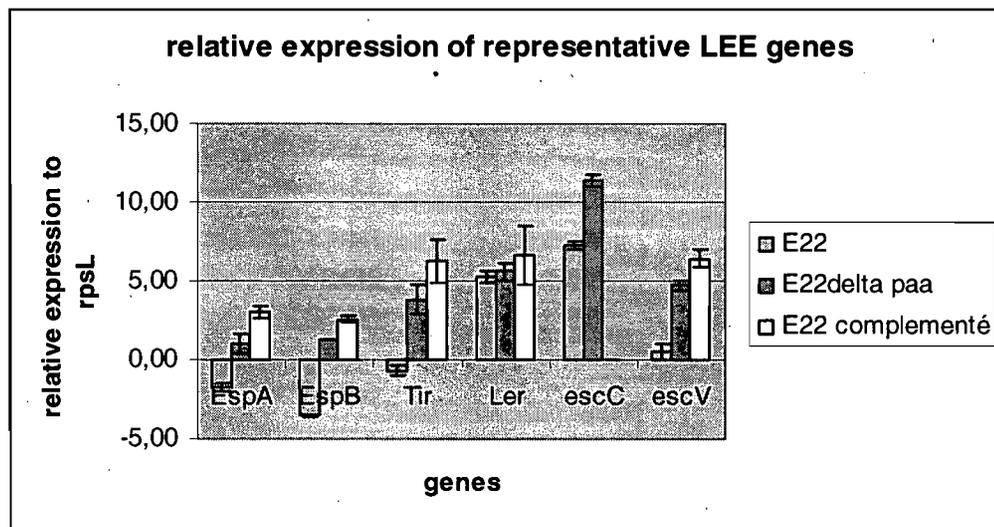


Figure 5: Transcriptional profiles of LEE expression for E22, E22 Δ *paa* and for E22 Δ *paa* FGC. Strains were grown to OD600nm 1.0 in MEM. Primers used for each gene are indicated in Table 1 (article). CT values were normalized to levels of *rpsL* rRNA to correct for variations in bacterial numbers

On observe chez la souche lapine E22 Δ *paa* une diminution importante et significative de la transcription des gènes du LEE. Il semblerait donc que Paa influence la transcription des gènes du LEE. Ces résultats sont différents de ceux observés avec la souche d'origine porcine ECL1001 et ses dérivées où la transcription des gènes du LEE n'est pas influencée significativement. Alors que Paa influence le niveau de la transcription des gènes du LEE de la souche E22. Il est possible que la régulation de la sécrétion par Paa de la souche REPEC soit différente de celle de la souche PEPEC. En effet, quoique

plusieurs régulateurs agissent de façon similaires chez les gènes du LEE des souches EHEC et EPEC, on retrouve des différences importantes au niveau de la régulation. On sait qu'il y a d'importantes différences génétiques parmi les souches AEEC. Il est aussi possible que la cinétique de sécrétion de la souche REPEC soit différente de celle de la souche PEPEC. Les ARN messagers qui sont récupérés à une D.O de 1.0 pour faire l'expérience de qRT-PCR pourraient être moins stables ou moins accumulés chez la souche PEPEC comparés à celle REPEC E22.

Annexe 7

Analyse des culots bactériens de la souche EDL933 et ses dérivés à $DO_{600nm}=1.0$ après incubation en milieu MEM. Dépôt de 5 μ l.

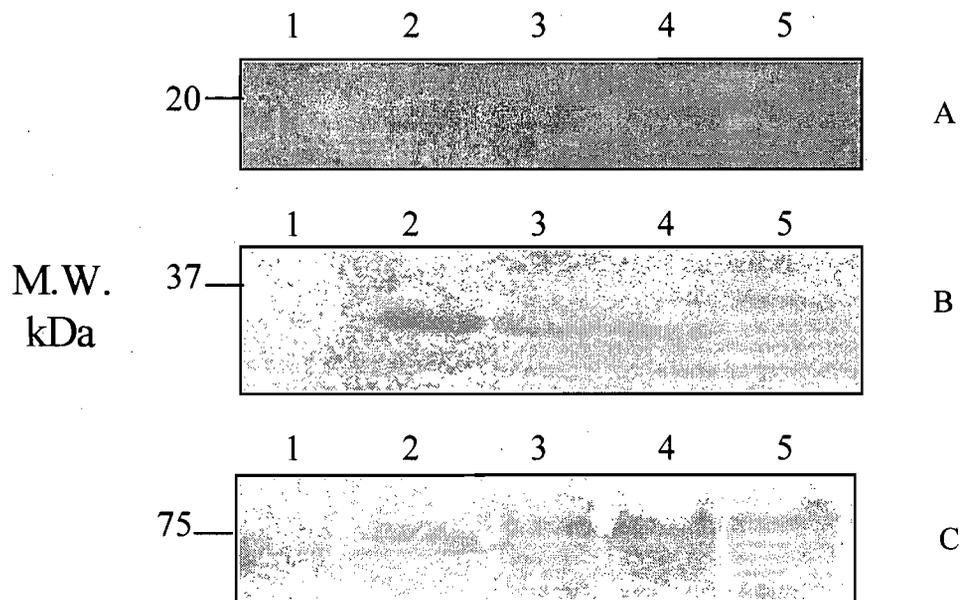


Figure 6. Paa is not important for efficient type III protein production at $OD_{600nm}=1.0$. Western blot for TTSS-dependant secreted proteins of EDL933 and its derivatives.(A): Anti-EspA on whole cells; (B): Anti-EspB on whole cells; (C): Anti-Tir on whole cells.

Lane 1, MG1655 K-12; Lane 2, EDL933; Lane 3, DST03; Lane 4, DST04; Lane 5, DST05.

Annexe 8

Contrôle périplasmique pour vérifier que la surexpression de Paa n'entraîne pas la lyse de la paroi bactérienne.

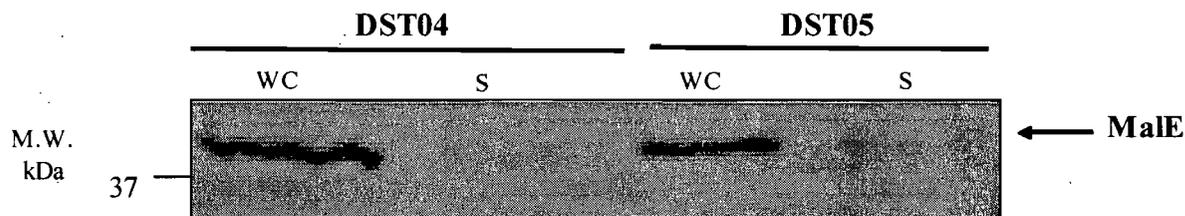


Figure 7. Western blot for MalE. Fractions of whole cells (WC) and supernatant (S) were tested using anti-MalE. The absence of the periplasmic protein MalE from the supernatants containing the secreted proteins indicated that this was not due to lysis of the cells (Fig. 5).

MalE est présent dans le culot bactérien mais absent dans le surnageant des souches DST04 et DST05. Ceci indique que le contenu périplasmique ne se retrouve pas dans le surnageant bactérien. La surexpression de Paa n'entraînerait pas une lyse de la membrane bactérienne.

Annexe 9

Analyse des culots bactériens en fin de phase stationnaire soit 5 heures d'incubation en milieu MEM pour les souches ECL1001 et EDL933 et leurs dérivés.

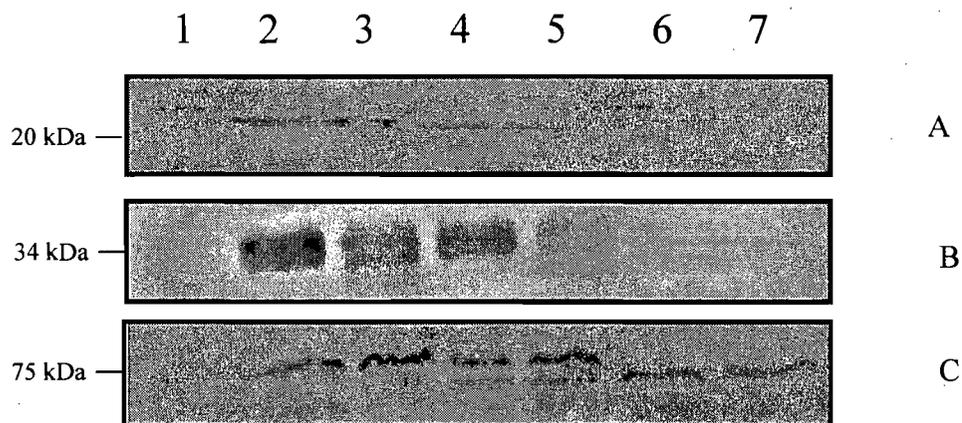


Figure 8. Paa is not important for efficient type III protein production. Western blot for TTSS-dependant secreted proteins of ECL1001 and EDL933 and its derivatives.(A): Anti-EspA on secreted proteins ; (B): Anti-EspB on secreted proteins ; (C): Anti-Tir on secreted proteins.

Lane 1, MG1655 K-12; Lane 2, ECL1001; Lane 3, DST01; Lane 4, M155; Lane 5, DST02; Lane 6, EDL933; Lane 7, DST03.

Annexe 10

Analyse du surnageant bactérien de la souche DH5 α Pir pTrc99a::*paa* en fin de phase exponentielle soit 3 heures d'incubation en milieu LB et MEM .

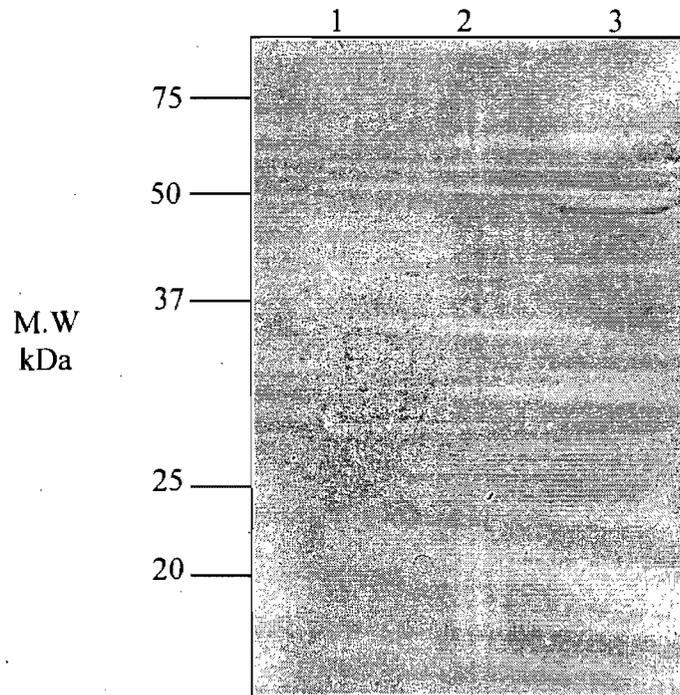


Figure 9. Paa is important for protein secretion in DH5 α Pir. Coomassie blue stained SDS-PAGE of secreted proteins of DH5 α Pir pTrc99a::*paa*.

Lane 1, DH5 α Pir pTrc99a::*paa* sans IPTG en LB; Lane 2, DH5 α Pir pTrc99a::*paa* avec IPTG en LB; Lane 3, DH5 α Pir pTrc99a::*paa* avec IPTG en milieu MEM.

Lorsque *paa* est surexprimé en milieu MEM, on retrouve dans le surnageant de la souche *E. coli* K-12 DH5 α Pir quelques protéines. La souche DH5 α Pir ne possède pas de SSTT, les protéines retrouvées dans le surnageant d'*E. coli* K-12 sont indépendantes du ce système. Paa influencerait la sécrétion de protéines chez *E. coli* K-12.