

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

**Cinétique de la réponse cytokinaire lors d'infections aux
Escherichia coli entéropathogènes dans un modèle de
culture d'iléon (IVOC) d'origine porcine**

par

Maurice Junior Dubois

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



Avril 2008

© Maurice Junior Dubois, 2008

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé

Cinétique de la réponse cytokinaire lors d'infections aux
Escherichia coli entéropathogènes dans un modèle de
culture d'iléon (IVOC) d'origine porcine

présenté par

Maurice Junior Dubois

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes

Ann Letellier, président-rapporteur

John Morris Fairbrother, directeur de recherche

Éric Nadeau, codirecteur

Pierre Hélie, membre du jury

Résumé

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) ont pu être observés causant des lésions de type attachant et effaçant (A/E) dans un modèle de culture intestinale porcine (IVOC). Cependant, la réponse immunitaire de l'hôte en réponse aux infections par les EPEC est moins bien comprise. L'objectif de nos recherches était d'adapter le modèle IVOC porcine afin d'étudier la cinétique de la réponse cytokinique de l'hôte en comparaison avec le développement de lésions A/E suite à une infection par une souche EPEC. La cinétique de la transcription de cytokines pro-inflammatoires, Th1 et Th2 a été suivie durant les 12 premières heures de l'infection en utilisant la technique de RT-PCR. Nous avons tout d'abord observé une hausse transitoire significative de l'IL-4 à 4 heures suivant l'infection. Cette hausse fut suivie par une augmentation graduelle de l'IL-10, qui est devenue significative à 12 heures suivant l'infection, comparativement avec notre groupe contrôle, lorsque les lésions A/E et les microcolonies étaient plus fréquemment retrouvées. Une légère tendance statistique à la hausse pour l'IL-6 a pu être observée à 8 et 12 heures suivant l'infection, mais aucun changement pour l'IL-8. Une hausse de l'IL-6 a déjà été rapportée lors de l'infection de porcelets sevrés avec la même souche EPEC porcine, démontrant le potentiel de cette technique pour l'étude de la réponse cytokinique de l'hôte. Notre étude suggère une balance pro- et anti-inflammatoire qui est activée très tôt suite à l'infection. De plus, notre étude suggère un nouveau lien entre le développement des lésions A/E et l'expression de l'IL-4.

Mots-clés : *Escherichia coli* attachant et effaçant, porc, IVOC, explant, cytokine, cinétique.

Abstract

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) have been shown to cause attaching and effacing (A/E) lesions in pig intestinal *in vitro* organ cultures (IVOC). However, the host immune response to EPEC infection is less well understood. The objective of our research was to adapt the IVOC model to study the kinetics of the host cytokine response to a porcine EPEC infection in relation to the development of A/E lesions in the porcine IVOC. The kinetics of the gene expression of pro-inflammatory, Th1 and Th2 cytokines was evaluated during the first 12 hours of infection in ileal explants using RT-PCR. We first observed a significant transient increase in the transcription of IL-4 at 4 hours post-infection. This was followed by a gradual increase for IL-10, being significant at 12 hours post-infection, compared to our non-infected group, when A/E lesions and bacterial microcolonies were predominant. Furthermore, a slight increase for IL-6, but no change for IL-8, was observed in infected explants at 8 and 12 hours post-infection. We had previously observed an enhanced production of IL-6 in the ileum of weaned pigs challenged with this same EPEC strain, underlining the potential of IVOC for the study of the host immune response in controlled conditions. Our results suggest that a pro- and anti-inflammatory balance is triggered very early in the development of A/E lesions and may play a key role in controlling infection by EPEC. Furthermore, a novel link between the expression of IL-4 during infection and the development of A/E lesions is suggested.

Keywords : Attaching and effacing *Escherichia coli*, pig, IVOC, explant, cytokine, kinetics

Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	iv
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	vii
Liste des figures.....	viii
Liste des abréviations.....	x
Remerciements.....	xiii
Introduction.....	1
Recension de la littérature.....	6
1 <i>Escherichia coli</i>	7
1.1 Généralités.....	7
1.2 Classification.....	8
1.2.1 Commensale vs pathogène.....	8
1.2.2 Classification des <i>E. coli</i> pathogènes.....	9
1.2.2.1 Pathotypage.....	9
1.2.2.2 Virotypage.....	10
1.2.2.3 Sérotypage.....	11
1.3 Les <i>E. coli</i> attachants et effaçants (AEEC).....	12
1.3.1 Les EPEC.....	12
1.3.2 Les STEC.....	13
1.3.2.1 Pathogénèse des infections à EPEC.....	14
1.3.2.2 Lésions microscopiques lors d'infections aux EPEC.....	21
1.3.2.3 Locus d'effacement des entérocytes (LEE).....	24
1.3.2.4 Facteurs non-LEE.....	24

2	Modèles d'étude pour les lésions de type A/E	25
2.1	<i>In vitro</i>	25
2.2	<i>In vivo</i>	26
2.2.1	Modèle d'infection de lapin	26
2.2.2	Modèles d'infection de porc	27
2.2.3	Modèle d'infection de souris avec <i>Citrobacter rodentium</i>	27
2.3	IVOC	28
3	Réponse immunitaire de l'hôte	30
3.1	Immunité mucoale	30
3.1.1	Différences microscopiques et macroscopiques de la muqueuse intestinale	30
3.1.2	Généralités de l'immunité mucoale intestinale	33
3.2	Cytokines	35
3.2.1	Fonctions	35
3.2.2	Propriétés	35
3.2.3	Rôles et structures dans la défense immunitaire	36
3.3	Réponse cytokinaire aux infections aux AEEC	39
	Matériels et méthodes, et résultats	42
	Article	
	Kinetics of the host cytokine response to attaching and effacing <i>Escherichia coli</i> (AEEC) infection in newborn pig ileal <i>In Vitro</i> Organ Culture (IVOC)	44
	Discussion & Conclusion	71
	Bibliographie	82
	Annèxes	I

Liste des tableaux

Article

Table 1: Oligonucleotide primers and conditions used for RT-PCR	70
------------------------------------------------------------------------------	----

Annexes

Annexe Tableau I. Échelle de dégradation des explants basée sur la quantité relative de villosités et/ou d'épithélium détaché par explant mise en place pour évaluer de façon semi-quantitative la dégradation des tissus.	III
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

Liste des figures

Recension de la littérature

Figure 1. Bactérie d'une souche EPEC d'origine humaine exprimant le BFP tel que démontré par microscopie électronique à coloration négative.....	16
Figure 2. Schéma du T3SS chez les EPEC.	17
Figure 3. Représentation schématique du rôle de la protéine chaperonne CesT dans le recrutement des protéines.....	18
Figure 4. Translocation de protéines à la cellule hôte par le T3SS chez les EPEC.	19
Figure 5. Pathogénèse des infections à AEEC en trois étapes principales.....	20
Figure 6. Bactéries EPEC adhérees à la surface d'une villosité intestinale observées par microscopie optique et colorées à l'hématoxyline et l'éosine.	21
Figure 7. Lésions de type A/E observées par microscopie électronique à transmission.....	22
Figure 8. Lésions de type A/E observées par microscopie électronique à balayage.....	23
Figure 9. Schéma de la muqueuse intestinale et localisation des plaques de Peyer chez le porc.....	31
Figure 10. Schéma de l'immunité mucoale au niveau intestinal.	34
Figure 11. Schéma représentant la différenciation et la régulation des lymphocytes T.....	38

Article

Figure 1. Representative graph of cytokine mRNA expression during the incubation of non-infected newborn ileal pig explants.	66
Figure 2. A) Relative proportion of villi with bacteria adhering to intact epithelium on intestinal IVOC explants. Cytokine mRNA expression for B) IL-4, C) IL-10, and D) IL-6 in explants during PEPEC infection using a newborn pig ileal IVOC model.	67
Figure 3. IFA micrograph showing attachment of individual bacteria and formation of microcolonies of the PEPEC strain ECL 1001 on the epithelial cell layer of a villus in a porcine ileal explant at 12 hours post-infection.	68

Figure 4. TEM micrograph showing intimate attachment of bacteria with effacement of the microvilli at the site of bacterial adherence, after inoculation of a porcine ileal explant with the PEPEC strain ECL 1001. 69

Annexes

Annexe Figure 1. Exemples des différents niveaux de dégradation tel qu'observé dans les coupes histologiques des explants colorés au HPS.II

Liste des abréviations

α	alpha
β	beta
γ	gamma
κ	kappa
μ	micro
A/E	attachant-effaçant
AEEC	attaching and effacing <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> attachant et effaçant)
BFP	bundle-forming pilus
Ces	chaperone for <i>E. coli</i> secretion
CesT	chaperone for <i>E. coli</i> secretion of Tir
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing gene (codant pour l'intimine ou Eae)
EAggEC	enteroaggregative <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entéroaggrégatif)
EAST1	EAggEC heat-stable enterotoxin 1
EHEC	enterohemorrhagic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entérohémorragique)
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entéroinvasif)
EPEC	enteropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entéropathogène)
EspA	EPEC secretory protein A
EspB	EPEC secretory protein B
EspG	EPEC secretory protein G
ETEC	enterotoxigenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> entérotoxigène)
ExPEC	extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> pathogène extra-intestinal)
GALT	gut-associated lymphoid tissues (tissu lymphoïde associé à l'intestin)
IEL	intraepithelial lymphocyte (lymphocyte intraépithélial)
INF- γ	interféron γ
IgY	immunoglobuline Y
IL	interleukine

IVOC	<i>in vitro</i> organ culture (culture d'organe <i>in vitro</i>)
LEE	locus of enterocyte effacement (locus d'effacement des entérocytes)
LP	lamina propria
MALT	mucosal-associated lymphoid tissues (tissu lymphoïde associé aux muqueuses)
Map	mitochondrial associated protein
NF- $\kappa\beta$	nuclear factor $\kappa\beta$ (facteur nucléaire $\kappa\beta$)
<i>paa</i>	porcine attaching and effacing associated gene
PEPEC	porcine EPEC (EPEC du porc)
Per	plasmid encoded regulator
PP	plaques de Peyer
REPEC	rabbit EPEC (EPEC du lapin)
T3SS	type 3 secretion system (système de sécrétion de type 3)
STEC	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> producteur de toxine Shiga)
Th1	lymphocytes T helper 1
Th2	lymphocytes T helper 2
Tir	translocated intimin receptor
TNF- α	tumor necrosis factor α
UPEC	uropathogenic <i>E. coli</i> (<i>E. coli</i> uropathogène)

*À ma famille, vous avez toujours été là pour
m'encourager à poursuivre...*

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, Dr John M. Fairbrother, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire à l'occasion de mon stage lors de mon baccalauréat et de m'avoir permis de poursuivre mes études en tant qu'étudiant à la maîtrise. Dans un deuxième temps, j'aimerais remercier aussi mon co-directeur, Dr Éric Nadeau, car à eux deux, ils m'ont permis d'apprendre beaucoup sur le monde de la science. De plus, leurs conseils m'ont toujours été très utiles.

Je tiens à remercier tous les membres et étudiants du GREMIP pour leur soutien.

Je tiens également à remercier tous les membres et étudiants du laboratoire EcL, en particulier Brigitte Lehoux et Jade-Pascale Prévost Lemyre pour leur aide lors de la manipulation des animaux.

Dans un dernier temps, je tiens à remercier mes parents pour leur soutien inébranlable ainsi que mon frère et ma sœur. Mes amis, pour leurs encouragements, l'usine Bridgestone de Joliette pour m'avoir employé en tant qu'étudiant et, finalement, Marie-Claude Cyr pour la correction de ce document. Merci à tous.

Introduction

Les *Escherichia coli* attachants et effaçants (AEEC) causent des lésions intestinales dites de type attachant et effaçant (A/E). Ces lésions sont caractérisées par une adhérence intime entre la bactérie et la cellule intestinale, l'effacement des microvillosités environnantes, le réarrangement de l'actine et la formation d'un piédestal composé d'actine polymérisé et d'autres protéines du cytosquelette sous le site d'adhésion (Chen et Frankel, 2005; Wales *et al.*, 2005; Kaper *et al.*, 2004; Nataro et Kaper, 1998). Les AEEC possèdent un système de sécrétion de type 3 (T3SS) qui est situé sur un îlot de pathogénécité appelé locus d'effacement des entérocytes (locus of enterocyte effacement, LEE). Ce dernier contient la plupart des éléments responsables du phénotype A/E et de la diarrhée qui résulte de l'infection (Chen et Frankel, 2005; Wales *et al.*, 2005; Kaper *et al.*, 2004; Nataro et Kaper, 1998). Les AEEC comprennent 1) les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), qui sont la cause de diarrhées chez les enfants des pays en voie de développement (Nataro et Kaper, 1998), le lapin (Cantey et Blake, 1977), le chien (Beaudry *et al.*, 1996) et le porc (Fairbrother *et al.*, 2005; Wales *et al.*, 2005; Hélie *et al.*, 1991), et 2) certains *E. coli* producteurs de toxine Shiga (STEC), dont ceux associés au sérotype O157:H7 (STEC_{O157:H7}). Certains groupes de STEC de type A/E, dont les STEC_{O157:H7}, sont responsables d'éclotions importantes de toxi-infection alimentaire chez l'humain, mieux connues sous le nom de « maladie du hamburger » (Nataro et Kaper, 1998). Malgré le fait que les AEEC colonisent un grand éventail d'hôtes, une grande proportion des infections ne résulte pas en maladie chez l'animal, les hôtes étant ainsi considérés comme des porteurs asymptomatiques de AEEC (Fairbrother et Nadeau, 2006). Finalement, *Citrobacter rodentium* est un pathogène naturel de la souris qui cause des lésions d'attachement et d'effacement similaires à celles des AEEC et qui est aussi utilisé comme modèle animal pour l'étude de ces derniers (Higgins *et al.*, 1999).

La majorité des études sur les AEEC se sont concentrées sur le pathogène, apportant une meilleure compréhension des mécanismes de l'infection. Cependant, la réponse

immunitaire de l'hôte lors de l'infection est moins bien connue. Des études *in vivo* ont démontré que le statut immunitaire de l'hôte joue un rôle très important dans le développement des lésions de type A/E. Par exemple, les porcelets n'ayant pas reçu de colostrum étaient plus susceptibles à l'infection par un PEPEC (porcine EPEC) que les porcelets en ayant reçu (Girard *et al.*, 2005b; Williams, 1993). De plus, dans un modèle *in vivo* d'infection par PEPEC, les porcelets sevrés devaient être préalablement traités avec de la dexaméthasone à doses immunosuppressives afin de favoriser le développement de lésions de type A/E (Girard *et al.*, 2005b). Ces études suggèrent que le développement de lésions de type A/E et l'apparition de signes cliniques lors d'une infection par AEEC seraient associés au statut immunitaire de l'hôte.

Il existe différents modèles *in vivo* (Girard *et al.*, 2005b; Ramirez *et al.*, 2005; Savkovic *et al.*, 2005; Beaudry *et al.*, 1996; Tzipori *et al.*, 1995) et diverses lignées cellulaires *in vitro* (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2007; Schierack *et al.*, 2006; Sharma *et al.*, 2006; Gobert *et al.*, 2005) qui ont déjà été utilisés pour étudier la réponse cytokinaire lors d'infection aux AEEC. Une hausse de la transcription de différentes cytokines, surtout de cytokines pro-inflammatoires, et dans certains cas aussi de cytokines dites anti-inflammatoires, a été observée lors d'infection dans des modèles de PEPEC chez le porc sevré (Girard *et al.*, 2005b), de REPEC chez le lapin (Ramirez *et al.*, 2005) et de *C. rodentium* chez la souris (Gobert *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 1999). Dans les modèles *in vitro*, une hausse de l'expression de l'IL-8 a été observée à la suite d'infection de lignées cellulaires par des souches AEEC (Sharma *et al.*, 2006, Gobert *et al.*, 2005). Le niveau de sécrétion de l'IL-8 serait par contre inversement proportionnel au niveau d'infection des cellules et serait dépendant de l'intégrité du T3SS (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2007, Sharma *et al.*, 2006). Cependant, comme les modèles *in vitro* de culture cellulaire consistent généralement en un seul type cellulaire, il est possible qu'ils ne reflètent pas la complexité de l'hôte.

Le modèle de culture d'organe *in vitro* (IVOC) dans lequel les cellules sont organisées en organe a déjà été utilisé pour l'étude de la pathogénie des AEEC chez le porc (Girard *et al.*, 2005a). Par exemple, un modèle IVOC composé de tissus intestinaux de porc a été utilisé pour étudier le rôle de l'intimine et de Tir dans le développement des lésions de type A/E par une souche PEPEC (Girard *et al.*, 2005a) et pour étudier l'utilisation d'anticorps IgY afin de bloquer l'adhérence des souches AEEC (Girard *et al.*, 2006). Cependant, ce modèle n'a pas été utilisé dans le passé pour l'étude de la réponse cytokinaire de l'hôte aux AEEC chez le porc.

L'hypothèse de ce projet de maîtrise était que tel qu'observé *in vivo*, les EPEC stimulent des patrons cytokinaires particuliers dans les tissus intestinaux en culture, ces patrons étant observés hâtivement à la suite de l'infection. L'objectif général de cette étude était d'étudier la cinétique de la réponse cytokinaire dans un modèle IVOC porcin en comparaison avec la cinétique de l'infection et du développement des lésions de type A/E associées à une souche PEPEC. Plus particulièrement, les objectifs de cette étude consistaient à :

1. adapter le modèle IVOC intestinal porcin décrit par Girard *et al.* (2005a) pour l'étude de la cinétique de la réponse cytokinaire;
2. étudier la cinétique de la réponse cytokinaire précoce en relation avec la colonisation et le développement des lésions de type A/E lors d'une infection par une souche PEPEC dans le modèle IVOC intestinal porcin.

L'adaptation du modèle IVOC décrit précédemment permettra un développement plus graduel des lésions à travers le temps, ce qui contribuera à mieux définir la cinétique de la réponse cytokinaire dès les premières heures suivant l'infection et la colonisation par la souche PEPEC.

Recension de la littérature

1 *Escherichia coli*

1.1 Généralités

Escherichia coli est une bactérie en forme de bâtonnet qui mesure entre 2 et 3 μm de longueur et 0,6 μm de largeur. C'est une bactérie à gram négatif qui est anaérobie facultative, c'est-à-dire qu'elle croît en présence d'oxygène, mais qu'elle peut aussi, en anaérobiose, fermenter le glucose pour survivre.

Cette bactérie peut croître à des températures variant de 20°C à 49°C; cependant sa température de croissance optimale est de 37°C, soit la température corporelle de la plupart des mammifères. Elle peut croître à un pH variant entre 4,5 et 9,5 (Pecizar et Chan, 1982) et, à condition optimale, son temps de dédoublement (temps pour que la population soit multipliée par deux) est de 20 minutes. La température létale de cette bactérie peut varier d'une souche à l'autre, mais est approximativement de 55°C (Sawai *et al.*, 2000).

E. coli croît bien dans les milieux nutritifs usuels tels les bouillons trypticase-soja (TSB) et Luria-Bertani (LB). Sa croissance sur gélose sang permet de mettre en évidence la présence ou l'absence d'une hémolysine. La culture sur gélose MacConkey permet de mettre en évidence sa fermentation du lactose. Pour ce qui est des *E. coli* O157:H7, il est possible de les mettre en évidence à l'aide d'une gélose MacConkey contenant du sorbitol (SMAC), car ces derniers sont incapables de fermenter ou fermentent très lentement ce sucre. Les colonies resteront donc incolores ou grises, alors que les autres *E. coli* apparaîtront rouges.

Afin d'identifier *E. coli*, plusieurs tests peuvent être effectués. Généralement, cette bactérie réagit positivement au test de l'indole et elle a une réponse négative aux tests de production de sulfure d'hydrogène et d'uréase. De plus, elle ne peut utiliser le citrate comme seule source de carbone (Gyles et Fairbrother, 2004).

1.2 Classification

1.2.1 Commensale vs pathogène

E. coli fait partie de la flore commensale intestinale des humains et de la plupart des animaux. Cette bactérie colonise rapidement l'intestin chez le nouveau-né, ce qui assure à ce dernier une certaine protection. Cependant, il existe certaines souches d'*E. coli* qui sont pathogènes et qui peuvent nuire à la santé des animaux et des humains. Ces souches pathogènes possèdent la capacité de coloniser et d'induire des dommages à son hôte en utilisant un ou des facteurs de virulence. Ces facteurs de virulence peuvent être, entre autres, des facteurs d'adhésion, des toxines ou des systèmes de sécrétion. De plus, certaines souches peuvent causer la maladie lorsque l'animal est affaibli ou immunosupprimé; ces *E. coli* sont dits opportunistes.

1.2.2 Classification des *E. coli* pathogènes

1.2.2.1 Pathotypage

La classification par pathotype est en fait une classification des *E. coli* selon leur mécanisme de pathogénicité ou les signes cliniques observés. Il existe plusieurs pathotypes couramment utilisés pour classer les *E. coli*. Voici les pathotypes les plus importants chez le porc.

Les *E. coli* enterotoxinogènes (ETEC) possèdent une ou des entérotoxines, telles LT, STa et/ou STb, ainsi qu'un ou des facteurs d'attachement, tels les fimbriaes F4, F5, F6, F18 et/ou F41. Les gènes codants pour les fimbriaes F4 ou F18 ont été identifiés chez 92,7 % des ETEC responsables de diarrhée post-sevrage chez le porc au Danemark (Frydendahl, 2002). La liaison du fimbriae à un récepteur spécifique de la surface de l'intestin de l'hôte permet la colonisation par la bactérie. Cependant, c'est l'action des toxines de la bactérie qui provoque la diarrhée.

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont des bactéries qui forment des liaisons intimes avec les entérocytes. Il y a attachement intime de la bactérie avec la cellule épithéliale et effacement des microvillosités environnantes, d'où l'appellation de lésions de type attachant et effaçant (A/E). Ces bactéries causent aussi des diarrhées chez le porc.

Les *E. coli* producteurs de toxine Shiga (STEC) produisent la toxine Shiga (anciennement Shiga-like toxin ou vérotoxine). Selon le type de STEC, les bactéries colonisent l'intestin de l'animal en formant des lésions de type A/E, ce qui engendrera une entérocolite, ou bien à l'aide du fimbriae F18. Une fois sécrétée dans la lumière intestinale, la toxine Shiga (Stx) peut passer ensuite dans le sang où elle va causer des dommages aux organes cibles. Chez le porc, un STEC particulier dont l'adhésion est généralement causée par le fimbriae F18 est responsable de la maladie de l'œdème. Dans ce cas, la toxine Shiga est de sous-type Stx2e.

Les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) sont des bactéries qui font généralement partie de la flore intestinale et qui, lors d'une faille du système immunitaire, vont se disséminer dans l'organisme et causer des lésions dans des tissus autres que l'intestin. Ils possèdent des facteurs de virulence qui peuvent leur permettre d'envahir, de s'attacher, de produire des toxines, d'échapper au système immunitaire et de survivre dans les tissus extra-intestinaux. Les ExPEC peuvent être subdivisés selon le site d'infection, tels les UPEC (uropathogenic *E. coli*) qui causent des infections du tractus urinaire. Les ExPEC ont aussi été associés à des méningites, des septicémies et des pneumonies. entre autres (Chapman *et al.*, 2006, Maynard *et al.*, 2004).

1.2.2.2 Virotypage

La classification par virotype est basée sur les facteurs de virulence présents chez la bactérie (Gyles et Fairbrother, 2004). En d'autres termes, le virotype est le profil de facteurs de virulence d'une bactérie. Par exemple, un des principaux virotypes responsables

de diarrhée post-sevrage chez le porc est STb:LT:EAST1:F4, les souches étant positives pour le facteur d'adhésion F4 et pour 3 entérotoxines. Le virotypage permet dans la majorité des cas d'identifier le pathotype des *E. coli*, la bactérie de l'exemple précédent étant un ETEC puisqu'elle possède des entérotoxines.

1.2.2.3 Sérotypage

La classification par sérotype fut développée par Friz Kauffmann en 1944, alors qu'il désirait caractériser les isolats d'*E. coli* selon leurs caractéristiques sérologiques. Il se basa sur les antigènes de surface : somatique O, flagellaire H et capsulaire K, afin de pouvoir les classer (Chen et Frankel, 2005). Depuis, plus de 175 antigènes O et 53 antigènes H ont été identifiés à ce jour. Pour ce qui est de l'antigène K, il a cessé d'être identifié de routine lors de la sérotypie, cette dernière consistant habituellement en la détermination des antigènes O et H (Gyles et Fairbrother, 2004). Par exemple, le sérotype O157:H7 est associé aux STEC et est une importante cause de toxi-infection alimentaire chez l'humain. Chez le porc, le sérotype O149 est maintenant le plus identifié dans les cas de diarrhée post-sevrage associés aux ETEC (Fairbrother *et al.*, 2005) et le sérotype O45 est associé aux EPEC (Gyles et Fairbrother, 2004).

1.3 Les *E. coli* attachants et effaçants (AEEC)

Les AEEC regroupent tous les *E. coli* pouvant produire des lésions de type A/E. Les pathotypes de *E. coli* pouvant produire de telles lésions sont les EPEC et certaines souches de STEC.

1.3.1 Les EPEC

Les EPEC peuvent causer de la diarrhée chez différentes espèces animales, telles le chien, le lapin et le porc, ainsi que chez l'humain. Parmi les principaux sérogroupes de EPEC impliqués dans les infections chez le porc, notons entre autres le O45 (Frydendahl, 2002). Malgré le fait que le mécanisme qui provoque la diarrhée soit encore mal connu pour les EPEC, l'attachement intime de type A/E semble être un prérequis (Gyles et Fairbrother, 2004). Chez le porc, les lésions de type A/E se localisent généralement dans la partie distale de l'iléon et dans le gros intestin. Cependant, la susceptibilité des porcs aux EPEC semble décroître avec l'âge (Wales *et al.*, 2005). Les EPEC seraient responsables d'environ 6 % des cas de diarrhée post-sevrage chez le porc (Fairbrother *et al.*, 2005). Chez le lapin, deux types de souches EPEC lapines (REPEC) basés sur les aspects cliniques ont été suggérés : l'un étant responsable de diarrhées liquides chez les lapins sevrés âgés d'environ 7 à 12 jours, et l'autre affectant les lapins sevrés âgés de 4 à 6 semaines (Wales *et al.*, 2005).

1.3.2 Les STEC

Les STEC sont impliqués dans la diarrhée et la dysenterie chez les veaux et les agneaux, ainsi que dans la maladie de l'œdème chez le porc. Chez les bovins et les moutons, les principaux sérogroupes associés à la diarrhée sont O5, O8, O20, O26, O103, O111, O118 et O145, tandis que chez le porc, les principaux sérogroupes sont O138, O139 et O141. Les lésions A/E sont la principale cause de la diarrhée, alors que la maladie de l'œdème est principalement causée par la toxine Shiga qui inhibe la synthèse de protéines cellulaires. Cependant, avant de sécréter la toxine Shiga, la bactérie doit se lier à l'épithélium intestinal. Chez le veau et l'agneau, certaines souches de STEC vont s'attacher à la muqueuse intestinale et produire des lésions de type A/E, si elles possèdent les gènes leur permettant de se lier intimement (Gyles et Fairbrother, 2004). Chez le porc, les STEC responsables de la maladie de l'œdème ne causent pas de lésions de type A/E, mais possèdent un facteur d'attachement de type fimbriaire, notamment le fimbriae F18 (Wales *et al.*, 2005). Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des bactéries STEC zoonotiques qui possèdent, en plus de la toxine Shiga et des gènes associés aux lésions de type A/E, d'autres facteurs de virulence tels une entérohémolysine, la toxine entéroagrégate thermostable 1 (EAST1) et une certaine résistance au pH acide. Le sérotype O157:H7 est un EHEC responsable d'épidémies importantes de toxi-infection alimentaire chez l'humain, mieux connu sous le nom de « maladie du hamburger ». La prévalence d'infections causées par les STEC est relativement faible dans les troupeaux, malgré le fait que le bétail en soit un réservoir important. Cependant, ce dernier point a un impact important sur la santé humaine, car le bétail porteur est majoritairement asymptomatique (Gyles et Fairbrother, 2004). De plus, ce sérotype n'est pas seulement retrouvé dans la viande. En octobre 2006, le « Center for Disease Control and Prevention » (CDC) aux Etats-Unis rapportait l'infection par ce sérotype de 199 personnes dans 26 états.

Les épinards frais servis dans les restaurants et vendus dans les supermarchés en étaient la cause (CDC, site Internet). Les EHEC sont responsables chez l'humain de diarrhées pouvant dégénérer en diarrhées hémorragiques et en syndrome hémolytique et urémique (SHU) pouvant causer la mort. Les STEC zoonotiques ont comme principal réservoir les ruminants, notamment le bovin.

1.3.2.1 Pathogenèse des infections à EPEC

Les porcs peuvent être porteurs asymptomatiques de souches EPEC dans leurs intestins. Lors de stress ou de maladies concomitantes, donc lorsque le système immunitaire de l'animal est affaibli, les souches EPEC normalement contrôlées dans l'intestin peuvent causer des lésions de type A/E et engendrer la diarrhée.

Les EPEC doivent d'abord être ingérées par l'animal. Suite à l'ingestion, la bactérie arrive à l'estomac où elle subit un stress dû au choc acide. Selon certaines études *in vitro* utilisant des cellules Hep-2, ce choc acide diminuerait la viabilité de la bactérie d'un facteur de 2,8, tout en augmentant l'adhésion de la bactérie pour la cellule hôte d'un facteur de 1,5 à 2,7. De plus, il semble que ce soit la surexpression de la protéine Hsp70 à la surface de la bactérie, suite au choc acide, qui favoriserait cette adhésion (de Jesus *et al.*, 2005). La bactérie arrive ensuite dans l'intestin grêle où elle subit un stress dû aux sels biliaires. Ces sels diminueraient la viabilité par un facteur de 1,4 à 1,6, tout en augmentant l'adhésion de la bactérie aux cellules hôtes d'un facteur de 1,3 à 2,6 (de Jesus *et al.*, 2005). Ces souches peuvent être, par la suite, excrétées dans les fèces et contaminer les autres porcelets par voie féco-orale.

Les EPEC peuvent être subdivisés en deux groupes distincts selon la présence de certains gènes : les typiques, qui possèdent un plasmide codant pour un pili appelé BFP (pour bundle-forming pilus; Figure 1) qui semble être associé à l'attachement initial des bactéries aux cellules épithéliales et participerait à la formation des microcolonies à la surface de l'épithélium, et les atypiques qui ne possèdent pas ce plasmide. Ce pili ne serait pas essentiel à la formation de lésions de type A/E puisque les souches exemptes de ce pili ont la capacité de produire ces lésions, mais il augmenterait l'efficacité de la formation de ces lésions (Trabulsi *et al.*, 2002). Les EPEC atypiques, soit ceux exemptes du plasmide, ont comme réservoirs naturels les animaux et les humains, contrairement aux EPEC typiques qui sont principalement d'origine humaine. Les EPEC atypiques sont cependant plus fréquemment retrouvés dans les infections chez l'humain comparativement aux EPEC typiques (Trabulsi *et al.*, 2002). De plus, certaines études ont démontré qu'il y aurait d'autres structures qui seraient impliquées dans l'adhérence initiale (Chen et Frankel, 2005). Les EPEC d'origine porcine sont atypiques puisqu'ils sont déficients pour un gène codant pour le pili BFP (Fairbrother *et al.*, 2005). Par contre, la protéine de surface Paa (porcine attaching and effacing associated protein) a été proposée comme adhésine dans les cas de diarrhées post-sevrage, tant chez les EPEC que les ETEC (Fairbrother *et al.*, 2005).

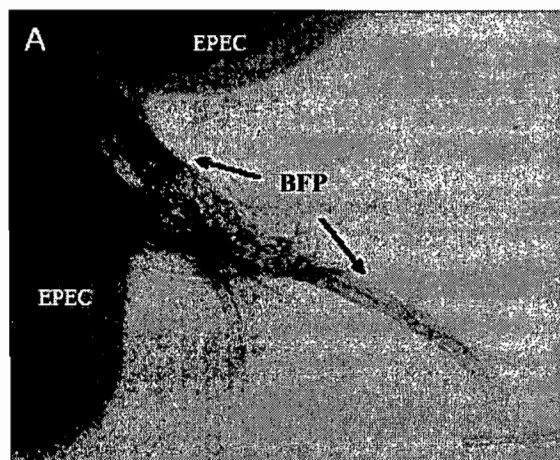


Figure 1. Bactérie d'une souche EPEC d'origine humaine exprimant le BFP tel que démontré par microscopie électronique à coloration négative (adapté de Ramboarina *et al.*, 2005).

Après l'adhésion initiale, la bactérie sécrète les facteurs responsables d'un système de sécrétion de type III (T3SS). Le T3SS est une seringue moléculaire qui permet aux bactéries d'injecter diverses molécules directement dans le cytoplasme de la cellule hôte. C'est un système de sécrétion transmembranaire composé de plusieurs protéines et séparé en trois parties : 1) un système de sécrétion qui traverse les deux membranes de la bactérie, 2) un assemblage de protéines qui forme un canal entre la bactérie et la cellule hôte et 3) un pore qui traverse la membrane de la cellule hôte (Figure 2).

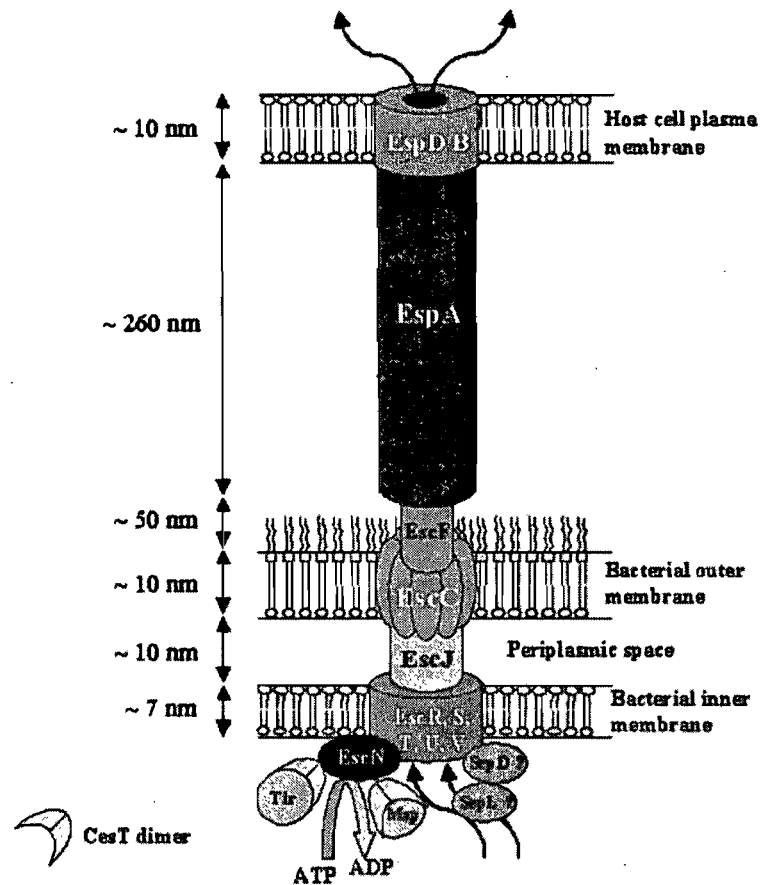


Figure 2. Schéma du T3SS chez les EPEC (Garmendia *et al.*, 2005).

Suite à l'attachement initial de la bactérie à la cellule hôte, il y a production de la protéine EspA qui produit le canal du système de sécrétion. De plus, il y a surproduction d'EspB et de Tir (translocated intimin receptor) dans la bactérie. Ces protéines, ainsi que d'autres, dont Map, sont nécessaires à l'infection de la cellule hôte et traversent le T3SS avec l'aide de la protéine chaperonne CesT (Figure 3). Cette dernière est essentielle à la colonisation et à la maladie chez l'hôte (Thomas *et al.*, 2005).

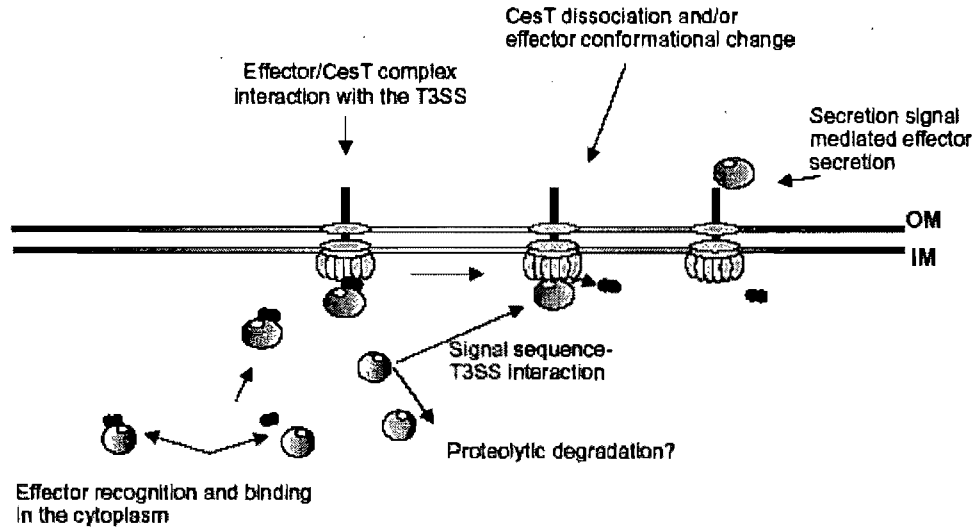


Figure 3. Représentation schématique du rôle de la protéine chaperonne CesT dans le recrutement des protéines. CesT lie la protéine à transloquer et va ensuite se lier à une protéine du T3SS afin de permettre sa translocation vers la cellule hôte (Thomas *et al.*, 2005).

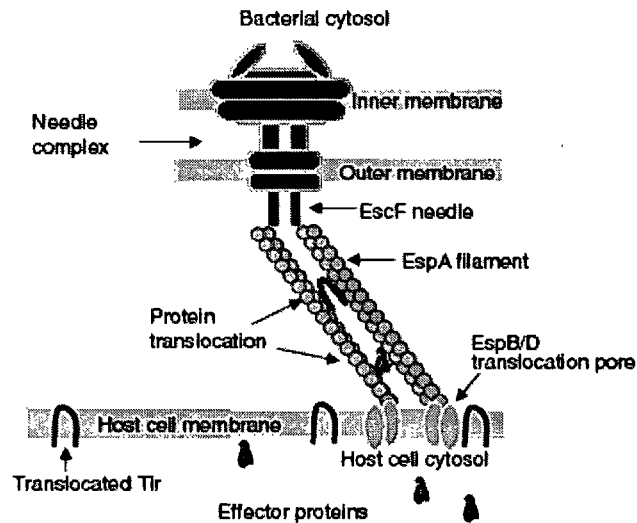


Figure 4. Translocation de protéines à la cellule hôte par le T3SS chez les EPEC (Chen et Frankel, 2005).

Le transfert des différentes protéines dans la cellule hôte et l'attachement intime de la bactérie à la cellule hôte occasionnent un réarrangement du cytosquelette cellulaire. Ce réarrangement commence par un effacement des microvillosités environnantes et se termine par la formation d'un piédestal sous la bactérie. La protéine Tir, une fois transférée par le T3SS, va se loger dans la membrane de la cellule hôte (Figure 4) et agit comme récepteur pour l'intimine (*eae*) présente à la surface de la bactérie. Les composantes du cytosquelette sont ensuite accumulées sous la bactérie pour former le piédestal. Suite à ce réarrangement, il y a liaison entre l'intimine et son récepteur Tir, permettant l'attachement intime entre la bactérie et la cellule hôte. (Girard *et al.*, 2005a). Le schéma général est illustré à la figure 5.

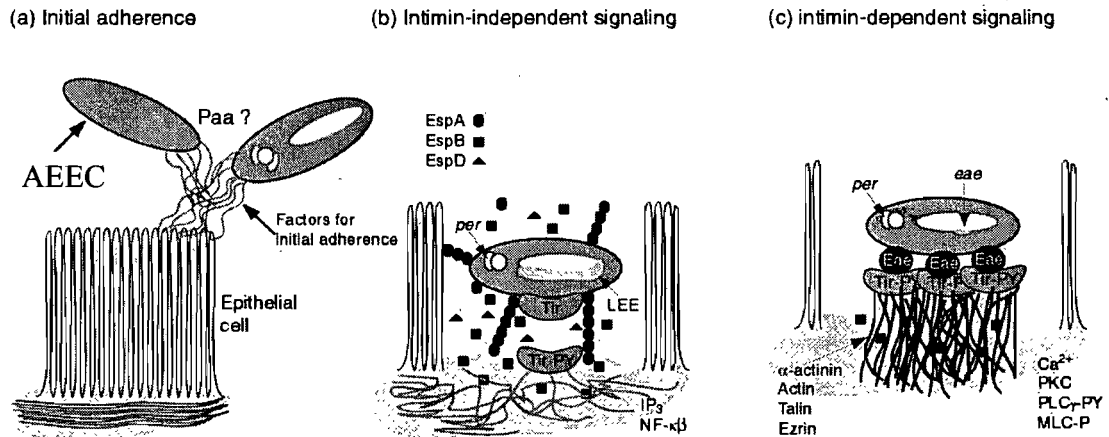


Figure 5. Pathogénèse des infections à AEEC en trois étapes principales : a) adhérence initiale b) signalisation indépendante de l'intimine c) signalisation dépendante de l'intimine (adapté de Girard *et al.*, 2005a).

Pour ce qui est des mécanismes d'induction de la diarrhée, les principes sont encore méconnus. La dépolarisation de la membrane de la cellule hôte est probablement le mécanisme effectif. Cependant, la nature des électrolytes ciblés et l'induction de leur sécrétion sont encore mal connus. Il a aussi été suggéré que l'effacement des microvillosités pourrait être responsable d'une diminution de l'absorption intestinale, causant la diarrhée. De plus, les protéines EspG et EspG2 altéreraient la perméabilité paracellulaire spécifique aux molécules de faible poids moléculaire en déstabilisant les jonctions serrées entre les entérocytes. Ceci permettrait le passage d'un flux entre les cellules épithéliales, tout en conservant la stabilité de la couche épithéliale qui conserve ses jonctions serrées (Matsuzawa *et al.*, 2005).

1.3.2.2 Lésions microscopiques lors d'infections aux EPEC

Lorsque l'on observe par microscopie optique les villosités intestinales infectées par des EPEC, il n'est pas possible de voir précisément les étapes de l'A/E. Cependant, on peut observer les bactéries adhérentes à la surface de la villosité (Figure 6).

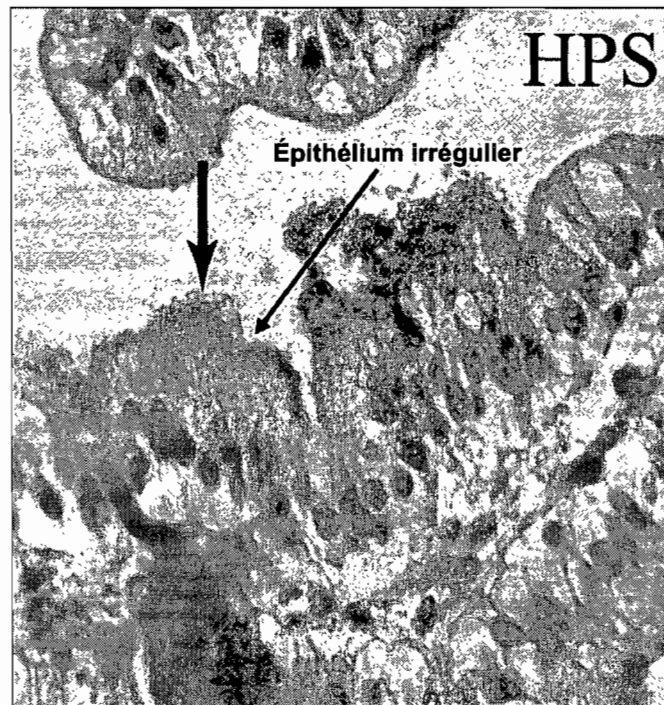


Figure 6. Bactéries EPEC adhérentes à la surface d'une villosité intestinale (flèche noire) observées par microscopie optique et colorées à l'hématoxyline, l'éosine phloxine et la safranine. De plus, tel qu'indiqué, l'épithélium est irrégulier là où les bactéries s'attachent (adapté de Girard *et al.*, 2005a).

Les lésions de type A/E peuvent être observées à l'aide de la microscopie électronique. La microscopie électronique à transmission nous permet d'observer la bactérie en attachement intime avec la cellule hôte, l'effacement de la bordure en brosse (microvillosités) et la structure en piédestal sous la bactérie. Il est possible d'observer dans la cellule, la condensation de l'actine sous la bactérie (zone plus dense) (Figure 7).

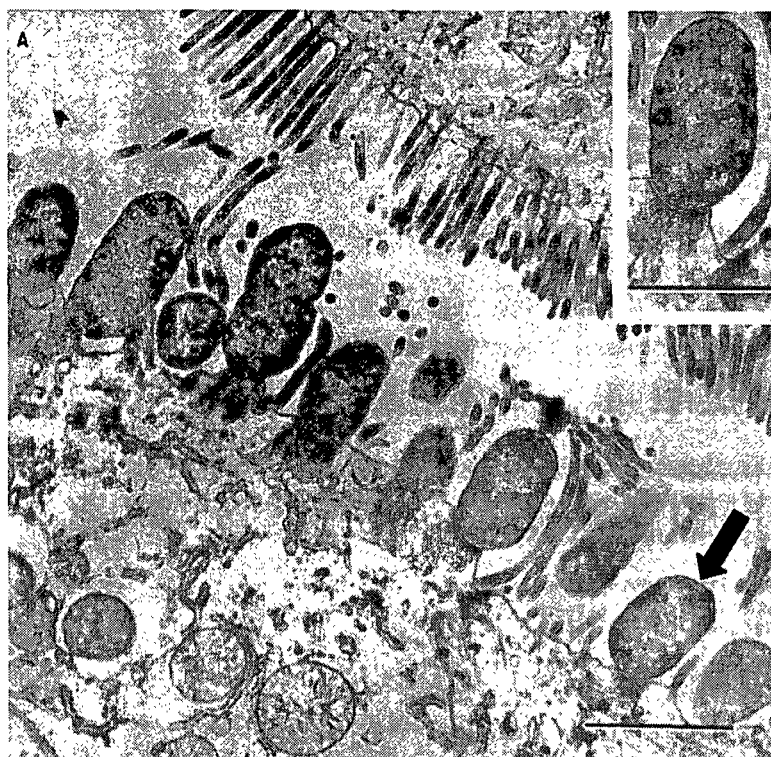


Figure 7. Lésions de type A/E observées par microscopie électronique à transmission. La flèche noire indique une bactérie en attachement intime avec la cellule hôte. La structure en piédestal et l'accumulation d'actine sous la bactérie sont visibles sous la bactérie dans l'encadré. La barre représente 1 μm (adapté de Hélie *et al.*, 1991).

L'observation par microscopie électronique à balayage permet de visualiser la surface de la muqueuse intestinale colonisée par les bactéries EPEC, la formation de microcolonies, l'intégrité de la bordure en brosse ainsi que l'effacement des microvillosités (Figure 8).

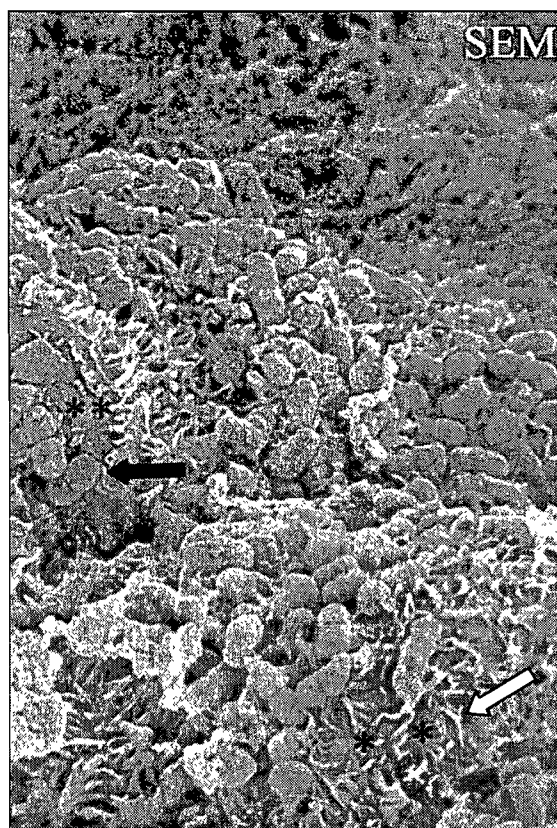


Figure 8. Lésions de type A/E observées par microscopie électronique à balayage. La flèche noire indique une bactérie en attachement intime avec la cellule hôte. Les astérisques représentent un effacement de la bordure en brosse et la flèche blanche représente des microvillosités de cette bordure en brosse (adapté de Girard *et al.*, 2005a).

1.3.2.3 Locus d'effacement des entérocytes (LEE)

Le locus d'effacement des entérocytes (LEE) est un îlot de pathogénicité de 36,5 kb décrit initialement chez les EPEC et retrouvé aussi chez les *E. coli* O157:H7 (LEE_{O157}; Gyles et Fairbrother, 2004). Sa composition G + C de 38 % est inférieure à celle du reste du chromosome de *E. coli* (50,8 %), suggérant que ce locus proviendrait d'un transfert génétique horizontal d'une autre espèce bactérienne. Le LEE est composé de 41 gènes séparés en 5 opérons. Les gènes codants pour le T3SS, certaines protéines sécrétées par ce système de sécrétion (*esp*) ainsi que leurs chaperonnes et, finalement, les protéines d'adhésion (Tir et intimine) se retrouvent sur le LEE (Chen et Frankel, 2005).

1.3.2.4 Facteurs non-LEE

Malgré le fait que plusieurs gènes essentiels aux lésions de type A/E se retrouvent sur le LEE, il existe d'autres gènes impliqués dans le développement de ces lésions mais retrouvés ailleurs sur le chromosome ou sur un plasmide. Le plasmide EAF des EPEC typiques possède certains de ces autres gènes qui agissent lors des lésions de type A/E, tels les gènes du système *bfp* qui codent pour la formation du BFP, et le pili de type IV observé chez certaines souches EPEC d'origine humaine. Les gènes *per*, situés sur ce plasmide, permettent la régulation de plusieurs gènes retrouvés autant sur le plasmide que sur le LEE, tels que l'expression du BFP et la transcription du gène *eae* (Frankel *et al.*, 1998). Les EPEC d'origine porcine sont atypiques puisqu'elles sont déficientes pour le gène *bfpA* et sont celles ciblées dans ce projet. Ces souches sont plus proches génétiquement des STEC, dont les O157:H7, que les EPEC typiques (Trabulsi *et al.*, 2002).

Le gène codant pour le facteur Paa est retrouvé sur le chromosome des EPEC, mais hors du LEE. Sa composition G + C de 44 % est inférieure à celle retrouvée sur le reste du chromosome. Lors d'une analyse avec anticorps couplés à des billes d'or, ce facteur fut retrouvé à la surface de la bactérie. Il a été suggéré que Paa serait un facteur nécessaire à l'apparition des lésions de type A/E pour les souches O45 d'origine porcine, un mutant *eae-* et *paa+* présentant des lésions de type A/E, alors qu'un mutant *eae+* et *paa-* n'en présentait pas (Batisson *et al.*, 2003).

2 Modèles d'étude pour les lésions de type A/E

2.1 *In vitro*

Les modèles d'étude *in vitro* des infections à AEEC sont composés principalement de lignées cellulaires immortalisées ou de cultures primaires de cellules. Il existe des lignées, humaines ou non, provenant de plusieurs types cellulaires. Les lignées T84 et Caco-2, provenant de cancers du côlon, ont souvent été utilisées pour étudier les mécanismes lésionnels des AEEC et pour évaluer l'expression des cytokines lors d'infections aux AEEC (Gobert *et al.*, 2005). La lignée intestinale d'origine porcine IPEC-J2 a récemment été caractérisée pour l'étude de la pathogenèse des infections bactériennes chez le porc (Schierack *et al.*, 2006). De plus, une lignée de cellules épithéliales gastro-intestinales bovines a déjà été mise au point pour l'étude des infections aux EHEC O157:H7 (Dibb-Fuller *et al.*, 2001).

Les lignées cellulaires ont grandement contribué à la connaissance des pathogènes en permettant de mieux comprendre les mécanismes d'infections des AEEC et de caractériser les lésions de type A/E. Des avantages de l'utilisation de ces lignées *in vitro* consistent en leur facilité de manipulation, leur coût relativement faible et la facilité à standardiser et à contrôler les paramètres d'étude. Cependant, le désavantage majeur, particulièrement lors d'études cytokinaires, est que ces lignées ne sont composées que d'un seul type de cellules, n'étant pas représentatif de la complexité de la muqueuse.

2.2 *In vivo*

2.2.1 Modèle d'infection de lapin

Le lapin est un modèle utilisé pour l'étude *in vivo* des EPEC puisque les lésions retrouvées chez ce rongeur sont similaires à celles observées chez l'humain. Il a de plus été démontré que ce modèle est efficace pour l'expression du phénotype A/E lors d'infections avec des STEC de différents sérotypes, l'adhérence bactérienne, l'effacement des microvillosités et la formation de la structure en piédestal pouvant être observés (Sherman *et al.*, 1988). De plus, ce modèle a été utilisé pour démontrer l'expression de cytokines pro- et anti-inflammatoires lors d'une étude sur le rôle d'EspA et de l'intimine d'une souche REPEC (Ramirez *et al.*, 2005).

2.2.2 Modèles d'infection de porc

Les infections aux AEEC ont été étudiées à l'aide d'un modèle utilisant des porcelets nouveaux-nés privés de colostrum (Hélie *et al.*, 1991). Comme leur système immunitaire n'est pas encore mature et qu'ils ne reçoivent pas de colostrum contenant des anticorps et des cytokines maternelles, les lésions de type A/E ont pu être observées. Afin de mieux représenter la réalité de l'infection des EPEC chez le porc, un modèle utilisant des porcs sevrés a été développé (Hélie *et al.*, 1991; Girard *et al.*, 2005b). Toutefois, le système immunitaire étant plus mature à cet âge, les lésions de type A/E étaient difficilement reproduites. Il a été suggéré que les infections aux EPEC chez le porc sevré seraient secondaires à une immunosuppression, probablement causée par des infections concomitantes (Girard *et al.*, 2005b). L'administration orale de dexaméthasone à doses immunosuppressives a résulté en une augmentation de la colonisation par une souche EPEC et du développement de lésions de type A/E dans le modèle de porcs sevrés (Girard *et al.* 2005b). Ce modèle a d'ailleurs été utilisé pour l'étude de la réponse cytokinaire aux infections par une souche PEPEC (Girard *et al.*, 2005b).

2.2.3 Modèle d'infection de souris avec *Citrobacter rodentium*

Citrobacter rodentium est un pathogène spécifique des rongeurs qui produit des lésions de type A/E. Le modèle d'infection de souris avec *C. rodentium* est régulièrement utilisé pour étudier les interactions hôte-pathogène associées aux lésions de type A/E étant donné l'éventail d'outils disponibles pour l'étude des souris. Cependant, les résultats obtenus avec ce modèle, particulièrement sur la réponse cytokinaire, peuvent ne pas être

applicables pour les AEEC chez les autres espèces animales (Gobert *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 1999).

2.3 IVOC

La méthode de culture d'organe *in vitro* (IVOC) consiste à extraire un organe d'un animal et de le mettre en culture sous forme d'explants. Ces explants sont composés de cellules organisées en organe, ce qui donne un modèle se rapprochant de la situation *in vivo*, tout en ayant plusieurs avantages des modèles *in vitro*. Les paramètres de la culture d'organe peuvent être contrôlés et standardisés, et un nombre élevé d'explants peut être produit à partir d'un seul animal. Ces explants peuvent ainsi être infectés selon différents paramètres et être par la suite récoltés à différents temps post-infection. Finalement, les explants récoltés peuvent être utilisés pour différentes analyses microscopiques (photonique, à fluorescence, à transmission, à balayage, etc.), d'expression et de transcription de gènes bactériens et de l'hôte, d'études de pathogénicité, de réponse de l'hôte, etc.

Les avantages de l'utilisation de l'IVOC sont que ce type de modèle est moins fastidieux, moins coûteux et nécessite moins d'animaux que les modèles *in vivo*. De plus, la variabilité inter-individu peut être réduite étant donné que l'on peut produire et comparer une grande quantité d'explants provenant d'un seul animal. Aussi, puisque la muqueuse est entière (ou en partie), la plupart des types de cellules du tissu sont présents pour l'étude, contrairement aux autres modèles *in vitro*. Cependant, le désavantage de cette technique, lorsqu'elle est comparée avec les modèles *in vivo*, est qu'il n'y a d'apport sanguin. Il y a

donc une certaine limite aux composantes sanguines qui peuvent être nécessaires à certains mécanismes biologiques.

Cette technique utilisant des explants intestinaux de porcelets a été utilisée à plusieurs reprises pour l'étude des infections aux AEEC, telles que pour l'étude des lésions causées par les EPEC O45 d'origine porcine (Zhu *et al.*, 1995), des souches EPEC isolées du chien (Beaudry *et al.*, 1996), du rôle du facteur de virulence Paa (Batisson *et al.*, 2003), du rôle de l'intimine et de Tir lors de l'infection (Girard *et al.*, 2005a) et de l'utilisation d'anticorps pour inhiber l'adhérence bactérienne (Girard *et al.*, 2006). Il a été démontré que l'IVOC est un modèle efficace pour l'étude de la pathogenèse des infections par AEEC (Girard *et al.*, 2005a).

Au commencement du projet, aucune échelle n'était décrite pour la dégradation des explants dans la littérature. Il a donc fallu en développer une selon une appréciation visuelle de coupes histologiques des explants colorées au HPS et en tenant compte de la quantité relative de villosités et/ou d'épithélium détachés de l'explant. Cette échelle peut être retrouvée à l'annexe.

À notre connaissance, une seule étude a démontré l'efficacité du modèle IVOC intestinal d'origine porcine pour l'étude de la réponse cytokinaire. Cependant, cette étude a été effectuée avec *Salmonella enterica* (Hyland *et al.*, 2006). Les auteurs ont démontré que ce pathogène du porc entraîne une hausse de certaines cytokines suite à l'infection.

3 Réponse immunitaire de l'hôte

3.1 Immunité mucoale

3.1.1 Différences microscopiques et macroscopiques de la muqueuse intestinale

Macroscopiquement, la muqueuse intestinale du porcelet présente d'abord des replis dans la muqueuse, recouverts de mucus et qui, à certains endroits, forment des renflements de forme rectangulaire qui correspondent aux plaques de Peyer (PP). Chez le porc, il est possible d'observer une longue PP continue au niveau du dernier tiers de l'iléum, près de la jonction iléo-caecale, ainsi que plusieurs petites plaques au niveau du jéjunum (Solano-Aguilar *et al.*, 2000; Figure 9).

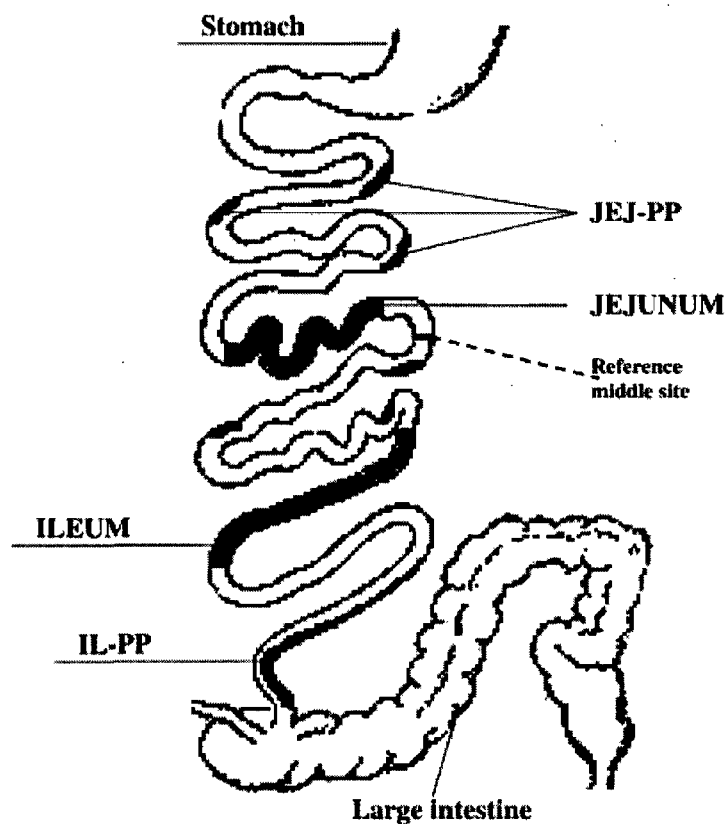


Figure 9. Schéma de la muqueuse intestinale et localisation des plaques de Peyer chez le porc. JEJ-PP : plaques de Peyer du jéjunum, IL-PP : plaques de Peyer de l'iléon (Solano-Aguilar *et al.*, 2000).

Microscopiquement, la muqueuse intestinale est d'abord constituée de l'épithélium qui se présente comme une couche cellulaire unique composée de différentes cellules qui recouvre l'intestin et qui est en contact avec la lumière intestinale (Figure 10). Cet épithélium simple est principalement composé de cellules cylindriques appelées entérocytes. Ces cellules possèdent de fines extensions à leur surface apicale, appelées microvillosités ou bordure en brosse, conférant à ce pôle une grande surface et un haut pouvoir d'absorption. Parmi les autres cellules de l'épithélium, notons entre autres les

cellules caliciformes qui produisent le mucus servant, entre autres, à lubrifier le contenu intestinal et à protéger l'épithélium, et les lymphocytes intra-épithéliaux. Les jonctions serrées entre les cellules de l'épithélium font en sorte qu'il n'y a pas d'espace entre les cellules (Wheater *et al.*, 2001).

Les cellules M retrouvées aussi dans l'épithélium sont entourées d'entérocytes et sont associées au PP. Les cellules M sont aplaties et dépourvues de microvillosités (Kuby *et al.*, 2001). Elles possèdent à leur pôle basal une invagination remplie de lymphocytes B et T ainsi que des macrophages. Les PP (Figure 10) sont des amas de follicules lymphoïdes réunis sous les cellules M. Les lymphocytes des cellules M sont en perpétuel contact avec ces follicules lymphoïdes.

Sous l'épithélium, on retrouve la lamina propria (LP) qui est délimitée en profondeur par la musculature de la muqueuse. La LP est un tissu conjonctif lâche composé de fibres de collagène lâches. À l'intérieur de celle-ci circulent différentes cellules immunitaires, dont des lymphocytes, des macrophages et des cellules dendritiques qui interagissent entre elles notamment à l'aide de cytokines, et participent avec les cellules des PP aux réponses immunitaires intestinales. L'épithélium formé avec la LP des villosités qui permettent d'augmenter la surface d'absorption au niveau de l'intestin (Wheater *et al.*, 2001). Entre et « sous » les villosités, on retrouve généralement les cryptes intestinales. Les PP se retrouvent anatomiquement dans la LP et la sous-muqueuse par des invaginations dans la musculature de la muqueuse.

3.1.2 Généralités de l'immunité mucoale intestinale

Les principaux médiateurs de l'immunité systémique sont le sang et les nœuds lymphatiques. Cependant, au niveau des muqueuses, l'immunité systémique n'est que peu efficace; les anticorps systémiques et les lymphocytes du sang traversent peu les muqueuses pour se rendre dans la lumière intestinale.

Un système immunitaire parallèle au système immunitaire systémique, le système immunitaire mucoal, est responsable de l'immunité au niveau des muqueuses. Les muqueuses des systèmes respiratoire, digestif et urogénital représentent les principaux sites d'entrée des pathogènes. Les tissus associés au système immunitaire mucoal sont regroupés sous le terme de « tissus lymphoïdes associés aux muqueuses » ou MALT (mucosa-associated lymphoid tissue). Ces tissus sont d'organisations diverses. Ils peuvent être composés de quelques cellules lymphoïdes ou bien être agencés en organe tels les amygdales, l'appendice ou les PP (Kuby *et al.*, 2001).

Au niveau de l'intestin, il est nommé « tissu lymphoïde associé à l'intestin » ou GALT (gut-associated lymphoid tissue). Le GALT est principalement composé de tissus lymphoïdes organisés, les PP, et des tissus lymphoïdes diffus dans la LP et l'épithélium (Figure 10). On retrouve notamment les cellules M et les lymphocytes intra-épithéliaux dans l'épithélium de l'intestin. Les lymphocytes intra-épithéliaux sont majoritairement des lymphocytes T CD8+. Les cellules M participent à l'échantillonnage et à l'entrée des antigènes dans les PP. La très grande concentration de lymphocytes T dans cet îlot permet la reconnaissance de l'antigène et l'induction de la réponse immunitaire. Les lymphocytes

T et B activés se distribueront dans la LP, un site effecteur, et amorceront la réponse immunitaire, dont la sécrétion d'anticorps mucosaux. La LP est riche en lymphocytes T CD4+, mastocytes, cellules dendritiques, macrophages et plasmocytes. Ces différentes composantes du GALT expriment des cytokines qui régulent la réponse immunitaire en plus de la production d'anticorps (Kuby *et al.*, 2001).

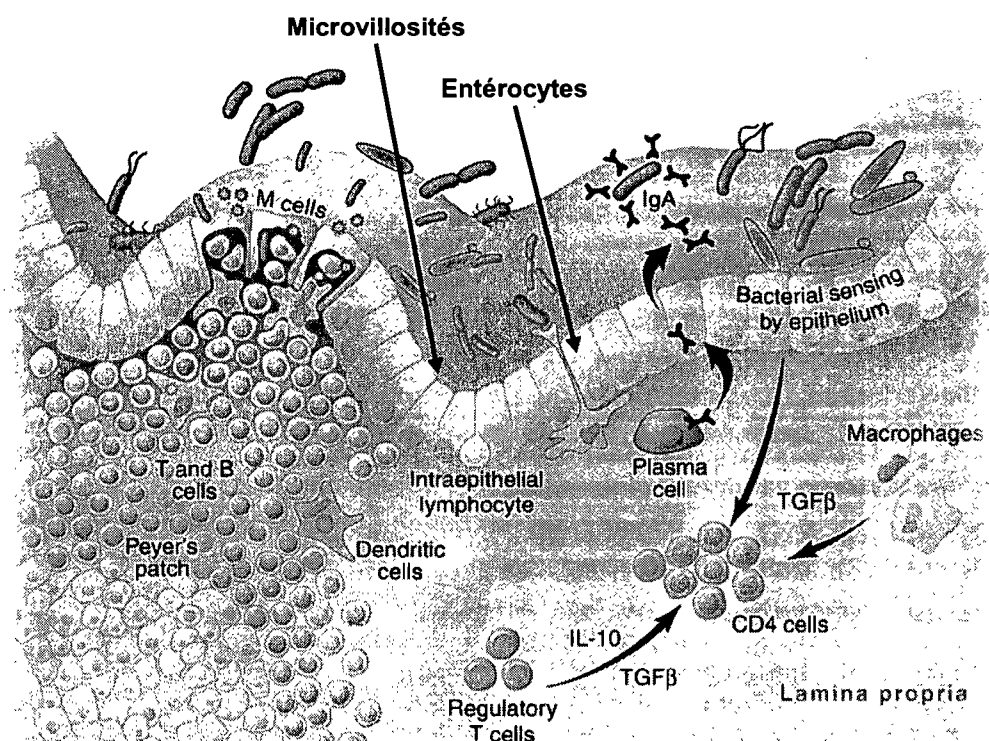


Figure 10. Schéma de l'immunité muqueuse au niveau intestinal (adapté de MacDonald et Monteleone, 2005).

3.2 Cytokines

3.2.1 Fonctions

Les cytokines sont des protéines de taille relativement petite, sécrétées par une cellule afin d'en influencer une autre. Elles servent à réguler la communication et les interactions entre les cellules. Elles influencent de nombreuses réponses physiologiques telles que le développement des réponses immunitaires et l'induction de la réponse inflammatoire. De plus, elles influencent la prolifération et la différenciation cellulaires ainsi que la cicatrisation (Kuby *et al.*, 2001).

3.2.2 Propriétés

Afin d'exercer leurs actions, les cytokines se lient à des récepteurs cellulaires. Ainsi, elles activent des voies de signalisation qui modifient la régulation et l'expression des gènes. Les cytokines peuvent interagir sur la cellule qui les a excrétées (autocrine), sur une cellule réceptrice située près de la cellule excrétrice (paracrine) ou, finalement, sur une cellule éloignée, voire dans un autre organe (endocrine)(Kuby *et al.*, 2001).

3.2.3 Rôles et structures dans la défense immunitaire

Il ne sera abordé dans cette recension de la littérature que les cytokines principalement rapportées dans différentes études sur les infections aux AEEC.

La réponse immunitaire peut être différenciée selon les patrons cytokinaires produits durant l'infection. Généralement, les premières cytokines produites lors d'une infection sont les cytokines pro-inflammatoires, telles l'interleukine (IL)-1, IL-6, IL-8 et le facteur de nécrose tumorale α (TNF- α). S'ensuivent les cytokines dites Th1, telles l'IL-2 et l'interféron γ (INF- γ), orientant la réponse immunitaire vers une réponse à médiation cellulaire, et les cytokines dites Th2, telles l'IL-4, IL-5, IL-10 et IL-13, orientant la réponse immunitaire vers une réponse à médiation humorale. Ces dernières induisent, entre autres, la différenciation des lymphocytes B et T et l'expansion clonale. Cependant, il est important d'assurer un contrôle de la réponse immunitaire afin d'éviter une inflammation chronique et de minimiser les lésions tissulaires. Des cytokines dites régulatrices, telles l'IL-10 sécrétée par des lymphocytes T régulateurs (Treg), vont participer à cette régulation (Azevedo *et al.*, 2006).

En plus des cytokines produites par les lymphocytes, d'autres cytokines produites notamment par les cellules présentatrices d'antigènes (macrophages et cellules dendritiques) vont influencer le développement de la réponse cytokinaire. L'IL-12 et l'IL-4 vont influencer le développement de la réponse immunitaire vers une réponse Th1 ou Th2, respectivement. Les cytokines de type Th1, telles que l'IL-12, IL-18 et l'INF- γ , vont promouvoir l'immunité à médiation cellulaire qui est particulièrement efficace contre les

pathogènes intracellulaires. L'IL-12 est sécrétée par les cellules présentatrices d'antigènes et va se lier aux lymphocytes T naïfs et aux cellules NK (Azevedo *et al.*, 2006). L'IL-18 est une protéine sécrétée majoritairement par les macrophages et les cellules dendritiques immatures, qui induit la sécrétion d'IFN- γ par les lymphocytes T et augmente la cytotoxicité des cellules NK (COPE, site Internet; Kuby *et al.*, 2001). Les cytokines de type Th2, telles que l'IL-4 et l'IL-10, induisent notamment la production d'anticorps neutralisants et l'expression du complexe d'histocompatibilité sur les macrophages. La fonction majeure de l'IL-4 est de promouvoir le développement de la réponse Th2 et de bloquer la plupart des effets activateurs de l'IFN- γ . Elle est produite par une grande variété de cellules telles les lymphocytes Th2 effecteurs et les cellules NK. L'IL-10, quant à elle, est produite par les lymphocytes T régulateurs et réduit la réponse inflammatoire en inhibant la production de cytokines par les macrophages et les lymphocytes Th1. De plus, cette cytokine induit la production d'anticorps IgA chez les lymphocytes T naïfs et initie la différenciation et la prolifération des lymphocytes B. L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle. Elle était reconnue au départ pour sa capacité à entraîner la différenciation des lymphocytes B et à stimuler la sécrétion d'anticorps. Cependant, de récentes études ont démontré que cette cytokine contribue entre autres à la protection des tissus lors d'infections (Gibson *et al.*, 2007; Eckmann, 2006).

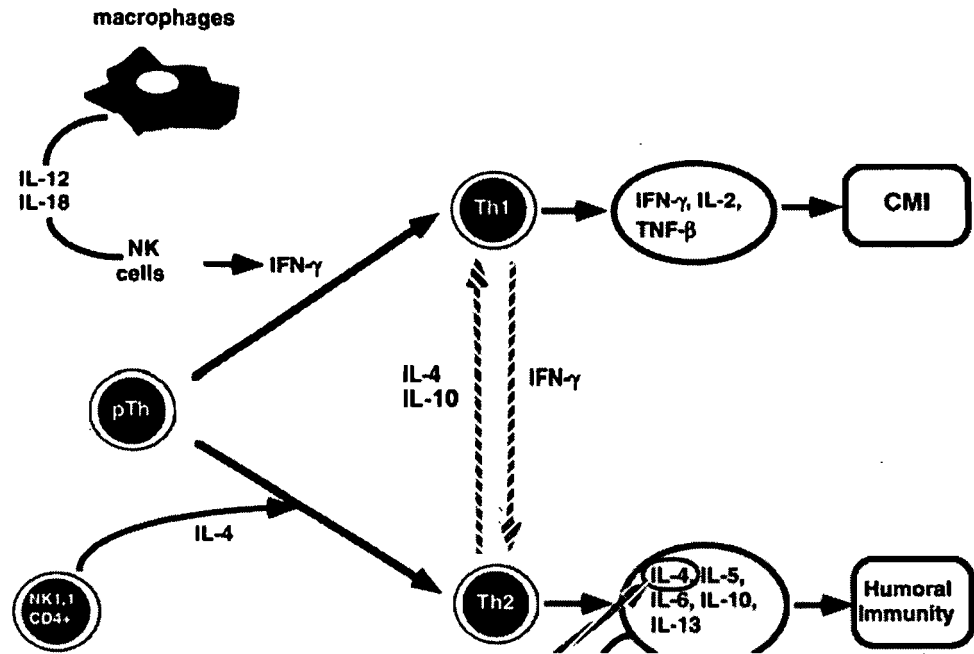


Figure 11. Schéma représentant la différenciation et la régulation des lymphocytes T. Les flèches pleines représentent une induction, et les flèches hachurées une inhibition. CMI : immunité cellulaire (adapté de van Ginkel *et al.*, 2000).

Depuis quelques années, une théorie d'une balance entre la réponse Th1 et Th2, le paradigme Th1/Th2, est mise de l'avant grâce aux modèles d'infection. Cette théorie suggère un équilibre entre les réponses immunitaires et certains facteurs du pathogène et/ou de l'hôte pouvant activer et inhiber les réponses de type Th1 et Th2 lors d'infections. Depuis que cette théorie a été proposée, les réponses immunitaires Th1 et Th2 ne sont plus considérées comme étant totalement distinctes et indépendantes, les deux types de réponses étant souvent requis, et parfois même observés pour permettre l'élimination de l'infection (Thacker *et al.*, 2007; Raymond et Wilkie, 2005).

3.3 Réponse cytokinaire aux infections aux AEEC

La réponse cytokinaire suite à l'infection par les AEEC fut étudiée à l'aide de modèles *in vitro* et *in vivo* et lors de cas cliniques chez l'humain.

Le modèle *in vitro* prédominant dans la littérature est celui utilisant la lignée cellulaire humaine T84. L'équipe de Savkovic fut la première à démontrer que les EPEC activent la sécrétion d'IL-8 par les cellules T84 (Savkovic *et al.*, 1997). Il a été rapporté par la suite que la quantité d'IL-8 sécrétée est inversement proportionnelle à la quantité d'EPEC présente sur les cellules HT-29 et Caco-2 (Sharma *et al.*, 2006). Ces auteurs ont de plus démontré que cette diminution, qui ne touchait pas seulement l'IL-8, mais aussi les voies de signalisation d'autres cytokines et d'agents anti-microbiens, était associée au T3SS (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2006).

Dans un modèle *in vivo* de lapin, il a été démontré que l'infection avec des REPEC activait l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles IL-1 β , TNF- α et IL-6, ainsi que de la cytokine anti-inflammatoire IL-10, par les entérocytes de l'intestin grêle lorsque comparée à une infection avec une souche non pathogène. De plus, les résultats furent similaires au niveau des PP, avec l'exception d'une augmentation d'IL-8, et une absence d'augmentation d'IL-10. Les auteurs suggèrent une similitude de la réponse de type Th1 avec celle observée dans le modèle de *C. rodentium*, tout en notant que la hausse d'IL-10, une cytokine anti-inflammatoire, vient « balancer » la réponse immunitaire (Ramirez *et al.*, 2005). Une activation de cytokines pro-inflammatoires a aussi été observée chez des porcelets nouvellement sevrés infectés par une souche PEPEC. Une augmentation d'IL-1 β ,

IL-6 et IL-12p40 a été observée au niveau des segments de l'iléon sans PP, ainsi qu'une augmentation d'IL-6 et IL-8 dans les PP, l'IL-10 n'ayant pas été analysée dans cette étude (Girard *et al.*, 2005b). Les auteurs de cette étude ont démontré que le statut immunitaire de l'hôte permet d'influencer le développement des lésions de type A/E.

Chez les souris infectées par *C. rodentium*, une forte réponse mucoale de type Th1 a été rapportée, une hausse du niveau de IL-1 β , IL-12p40, INF- γ et TNF- α ayant été observée à 6 et 12 jours post-infection (Gobert *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 1999). Toujours avec ce modèle, Eckmann (2006) démontrait l'importance de l'IL-6 dans le développement des lésions. Il rapportait que des souris déficientes pour le gène codant IL-6 souffraient de lésions plus importantes lors d'une infection par *C. rodentium* que les souris exprimant IL-6. Dans le même ordre d'idée, Gibson *et al.* (2007) suggéraient que la production d'IL-6 a un rôle protecteur lors d'une infection des souris par *C. rodentium*.

Similairement aux résultats obtenus dans les modèles *in vivo* animaux, une augmentation d'IL-6, IL-8, IL-10 et TNF- α a été observée dans des cas cliniques, plus spécifiquement dans le sérum d'enfants infectés avec une souche EHEC et présentant des symptômes de HUS (hemolytic uremic syndrome)(Murata *et al.*, 1998). Dans une autre étude similaire, une hausse de l'IL-8 et l'IL-10 a été observée dans le sérum du groupe d'enfants présentant un HUS lorsque comparé au groupe contrôle non infecté (Westerholt *et al.*, 2000). Les auteurs de ces deux études de cas cliniques suggèrent que l'IL-10 est prédominante dans le développement de la condition pathologique, l'effet anti-inflammatoire de l'IL-10 contrebalançant la réponse inflammatoire liée à l'infection.

En conclusion, les études suggèrent que les AEEC stimuleraient principalement une réponse pro-inflammatoire de type Th1. De plus, l'IL-6 et l'IL-10 seraient deux cytokines importantes dans l'évolution de la condition pathologique, leur présence diminuant les lésions et les dommages tissulaires. Ces résultats suggèrent qu'une balance pro- et anti-inflammatoire serait cruciale dans l'évolution de l'infection par les AEEC.

Matériels et méthodes, et résultats

Article

**Kinetics of the host cytokine response to attaching and effacing
Escherichia coli (AEEC) infection in newborn pig ileal
In Vitro Organ Culture (IVOC).**

Maurice Junior Dubois, John Morris Fairbrother and Éric Nadeau

Manuscrit soumis

Kinetics of the host cytokine response to attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) infection in newborn pig ileal *In Vitro* Organ Culture (IVOC).

Maurice Junior Dubois, John Morris Fairbrother * and Éric Nadeau

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

* Corresponding author. Mailing address: Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc (GREMIP), Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, C. P.5000, Québec, J2S 7C6, Canada. Phone: [information retirée / information withdrawn] Fax: [information retirée /

[information retirée / information withdrawn] E-mail: [information retirée / information withdrawn]

Running title: Host cytokine response to AEEC

Keywords: *E. coli*, attaching and effacing, ileal explant, cytokines, pig

Abstract

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) have been shown to cause attaching and effacing (A/E) lesions in swine intestinal *in vitro* organ cultures (IVOC). The objective of our research was to study the kinetics of the host cytokine response to a porcine EPEC infection in relation to the development of A/E lesions in the newborn pig intestinal IVOC. The kinetics of the gene expression of pro-inflammatory, Th1 and Th2 cytokines were evaluated during the first 12 hours of infection in ileal explants using RT-PCR. We first observed a statistically significant transient increase in the transcription of IL-4 at 4 hours post-infection. This was followed by a gradual increase of IL-10, being significant at 12 hours post-infection, when A/E lesions and bacterial microcolonies were predominant. Furthermore, a slight increase of IL-6, but no change in IL-8, was observed in infected explants at 8 and 12 hours post-infection. Our results suggest that a pro- and anti-inflammatory balance is triggered very early in the development of A/E lesions and may play a key role in controlling infection by EPEC and predicting clinical outcome. Furthermore, a novel link between the expression of IL-4 during infection and the development of A/E lesions is suggested.

Introduction

Attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) cause attaching and effacing (A/E) intestinal lesions which are characterized by intimate bacterial adherence to intestinal epithelial cells, effacement of the surrounding microvilli, F-actin rearrangement, and formation of a pedestal of polymerized F-actin and other cytoskeletal proteins underneath the adherence site (4, 19, 22, 34). The AEEC encode a type III secretion system (TTSS), located on a pathogenicity island called locus of enterocyte effacement (LEE), that delivers effector proteins in relation to the A/E lesions and diarrheal disease (4, 19, 22, 34). Certain AEEC, designated as enteropathogenic *E. coli* (EPEC), cause diarrhea in children, mostly in developing countries (22), in rabbits (3), dogs (1) and swine (10, 17, 34). Other AEEC are certain shiga toxin producing *E. coli* (STEC), including strains belonging to O157:H7, and are responsible for outbreaks of foodborne and waterborne illness in humans (22). *Citrobacter rodentium*, a natural mouse pathogen, also causes lesions similar to those of AEEC (18). Furthermore, despite the fact that AEEC pathogens have a wide range of hosts, many animals are asymptomatic carriers of these bacteria (9).

Most studies on AEEC to date have focused on the pathogen itself, leading to a better understanding of the mechanisms of infection. However, the host immune response to AEEC infection is less well understood. *In vivo* studies have shown that the host immune status is an important factor in the development of A/E lesions. For instance, colostrum-deprived piglets are more susceptible to infection than those having received colostrum (14, 35) and dexamethasone immunosuppression is required for development of A/E lesions in a post-weaning *in vivo* EPEC pig infection model (14).

Different *in vivo* models (1, 14, 24, 27, 33) and *in vitro* cell lines (15, 25, 28, 29), have been used to characterize cytokine expression during AEEC infections. In a post-weaning pig EPEC infection model (14), an up-regulation of mRNA expression of

cytokines IL-1 β , IL-6, IL-12p40 was observed in intestinal tissues of weaned pigs following oral challenge with a pig EPEC strain, whereas up-regulation of cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- α was observed in rabbits following oral challenge with a rabbit EPEC strain (24). In mice challenged with *C. rodentium*, a strong up-regulation in the expression of the mRNA of IL-1 β , IL-12p40, INF- γ and TNF- α was observed at 6 and 12 days post-infection, indicating a Th1 cytokine response (15, 18). An up-regulation in the expression of IL-8 was observed following EPEC infection of T84 cells (15) and HT-29 epithelial cells (29). The level of IL-8 secretion was shown to be inversely proportional to the extent of EPEC infection in a type III secretion system-dependant pathway, in polarized epithelial cells such as HT-29 (29) and Caco-2 (25). However, as they consist of only one cellular type, these cell lines do not accurately reflect the complexity of the host.

The *in vitro* organ culture (IVOC) model, in which cells are organized at the organ level, has previously been used to study the pathogenesis of A/E lesions in the pig (12). For instance, it was used to investigate the role of intimin and Tir in development of A/E lesions by pig EPEC (12) and the ability of specific egg yolk-derived immunoglobulins to block bacterial adherence of an AEEC strain (13). However, this model has not been used previously for the study of the cytokine response to AEEC in pigs.

The aim of this study was to evaluate the kinetics of the host cytokine response to porcine EPEC infection in relation to the development of A/E lesions in the newborn pig ileal IVOC model.

Material & Methods

Bacterial strain and growth conditions

The porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (PEPEC) ECL 1001 strain (formerly 86-1390) was isolated at the Reference laboratory for *Escherichia coli* (EcL), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Quebec, Canada) from a 4-week-old weaned pig with diarrhea (17). This O45:H- strain possesses a β -intimin subtype and induces cecal and colonic A/E lesions in gnotobiotic piglets (17), conventional neonatal piglets (36, 37), dexamethasone-immunosuppressed weaned pigs (11) and in porcine ileal IVOC (12). Bacteria were grown as previously described but with slight modifications (12). Briefly, bacteria were cultured overnight in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; GibcoBRL, Burlington, Ontario, Canada) under agitation at 37°C, then transferred in fresh DMEM, and cultured to an optical density of 0.7 at 600nm (OD₆₀₀) corresponding to approximately 9.0×10^6 CFU/ml in the early exponential phase. Bacteria that are grown in these conditions express LEE genes and are primed ready to produce A/E lesions (5). Before use, the bacterial culture was centrifuged and the pellet was then diluted to obtain a concentration of approximately 10^4 CFU/ml.

Collection and culture of porcine intestinal IVOC explants

A total of four IVOC experiments (quadruplicate) were performed, each using a different colostrum-deprived newborn piglet. The porcine intestinal IVOC model was adapted from the explant culture technique previously described by Girard et al. (12). Briefly, IVOC explants of the ileum were inoculated once with 50 μ l of broth culture at 10^4 CFU/ml in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) instead of 3 times with 50 μ l of broth culture at 10^7 CFU/ml. The broth culture was applied to the mucosal surface and IVOC intestinal explants were then incubated at 37°C on a rocker in 5% CO₂ for 12 hours

instead of 95% O₂ and 5% CO₂ for 8 hours. Changing of the IVOC culture media with sterile fresh complete RPMI 1640 medium was carried out every two hours following the inoculation of the segments, instead of every hour. These conditions resulted in a more gradual colonization and development of A/E lesions with minimal degradation of tissues. Non-infected explants were also cultured as a control group in order to confirm that no extraneous contamination occurred during the experimental process. Infected and non-infected explants were collected at necropsy, and 0 (before the infection), 4, 8 and 12 h post-infection, for analysis.

Histopathology

Explants were fixed in 4% paraformaldehyde for 16 to 26 hours, placed into nylon tissue biopsy bags (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA), processed, paraffin embedded, sectioned at 5µm, and stained with hematoxylin, phloxine, and safranin (HPS) according to standard techniques. Sections were examined for the presence of intimately adhering bacteria and microcolonies on intestinal villi by light microscopy as described by Girard et al (12). Sections were also examined to evaluate tissue degradation using a score based on the relative amount of epithelial and villous detachment.

Indirect immunofluorescence assay

An indirect immunofluorescence assay (IFA) specific for the O45 antigen was used, as described by Girard et al. (14) with modifications, to evaluate the proportion of intact villi colonized by the challenge strain EcL 1001 per IVOC intestinal explant. First, 5 µm sections of paraformaldehyde-fixed IVOC intestinal explants were deparaffinized, washed in PBS and treated with a blocking solution of PBS containing 3% bovine serum albumin. Explant sections were then incubated with a 1/200 dilution in PBS of rabbit anti-O45 antiserum, washed in PBS, and incubated with a 1/200 dilution in PBS of goat anti-rabbit

Fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugate (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). DNA of epithelial cells and bacteria was counterstained with 5 µg ml⁻¹ of 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), dilactate (Sigma-Aldrich Co., St Louis, Mo.). Sections were then mounted and examined with a Leica DMR microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with epifluorescence and UV excitation module (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT).

Electron microscopy

Electron microscopy was performed as described by Girard et al (12). Samples for transmission electron microscopy (TEM) were examined for the presence of A/E lesions at 80 kV with a Phillips 201 transmission electron microscope. For scanning electron microscopy (SEM), samples were examined at 5 kV in an S-3000 scanning electron microscope (Hitachi, Rexdale, Ontario, Canada).

Reverse transcription (RT)-PCR detection of cytokine mRNA

A total of 10 IVOC intestinal explants of 9-mm² were randomly collected at each time for each experiment, for mRNA isolation and purification. IVOC explants were conserved in TRIzol at -80°C until analysis. Explants were homogenized using a CAT X-120 homogenizer (PolyScience, Niles, Ill.) and total RNA was then extracted as recommended by the manufacturer. The RNA was resuspended in 25 µl of Promega Nuclease-Free Water (Fisher Scientific Company, Ontario, Canada) and treated twice with TURBOTM DNase (Applied Biosystems Canada, Ontario, Canada) as recommended by the manufacturer to remove residual DNA. The RNA was then precipitated with sodium acetate and resuspended in Promega Nuclease-Free Water. Total RNA was quantified using a ND-1000 Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, USA) at an optical density of 260 nm (OD₂₆₀), and the purity was assessed by determining both OD₂₆₀/OD₂₈₀

and OD₂₆₀/OD₂₃₀ ratios. All samples had an OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio above 1.8 and an OD₂₆₀/OD₂₃₀ ratio above 2.0. The RT-PCR procedure was performed as previously described (7) with minor modifications. Briefly, 1 µg of RNA was reverse transcribed (Superscript II Reverse Transcriptase, Invitrogen Canada Inc., Burlington, Ontario; RNase H, Épicentre, InterScience, Ontario, Canada) and suspended to a total volume of 100 µl. After reverse transcription, 5 µl of cDNA for cyclophilin and 10 µl for tested cytokines were amplified by PCR using deoxynucleoside triphosphates (2 mM each) (GE Healthcare, Mississauga, Ontario, Canada), 0.2 mM of sense and anti-sense primers, 2 mM MgCl₂ and 2.5 U of DNA *Taq* polymerase enzyme (Biotools, InterScience, Ontario, Canada) in a final volume of 50 µl. Primer sequences for tested cytokines and cyclophilin, annealing temperatures, and the number of PCR cycles are summarized in Table 1. The initial denaturation was carried out for 5 min for all tested cytokines and for 3 min for cyclophilin. Denaturation was carried out at 94°C for 1 min for all tested cytokines and for 45 s for cyclophilin. Extension was carried out at 74 °C for 1 min for IL-12p40 and INF-γ, at 72 °C for 1min for other cytokines, and at 72 °C for 45 s for cyclophilin. The final extension was carried out for 10 min for all tested genes.

Amplified DNA was analyzed by electrophoresis and the amount of each PCR product was quantified by densitometry using Bionumerics (Applied Maths, Inc., Austin, Tex.). To compare the relative cytokine mRNA expression levels among samples, the values were presented as the ratio of the band intensity of the cytokine-specific RT-PCR product over that of the corresponding constitutively expressed housekeeping gene cyclophilin.

Image capture

Images of histopathological and IFA examinations were captured with a CCD CoolSNAP camera (RS Photometrics, California), and processed with Adobe Photoshop 6.0 and Adobe Illustrator 8.0 (Adobe System Incorporated, California).

Statistical analysis

Results are presented as the mean of the 4 experiments. A linear model with repeated measures, with time and treatment as intra-subject factor, was performed with SAS 9.0. A *P* value of <0.05 was taken to be significant and a *P* value of <0.1 was taken to indicate a trend.

Results

All tested cytokines were expressed in non-infected IVOC newborn pig intestinal explants

Expression of genes encoding for each of the tested cytokines was observed in non-infected IVOC intestinal explants. The level of expression was similar throughout the 12 h culture period for all tested genes except for IL-6, the transcription being increased from 0 to 4 hours, and then gradually decreasing until the end of the experiment (Fig. 1). RNA transcription was higher for IL-6, IL-8, IL-18 and IL-10 than for IL-1 β , TNF- α , IL-12p40, INF- γ and IL-4 (Fig. 1).

Gradual development of A/E lesions and tissue degradation were observed following infection of IVOC newborn pig intestinal explants with a PEPEC strain

The proportion of intact villi colonized by the PEPEC strain was evaluated using IFA to study the kinetics of development of A/E lesions over the time. Only a few solitary bacteria were associated with the villous epithelium at 4 hours post-infection (Fig. 2a). A gradual increase in the proportion of colonized villi was observed over time, reaching 48 % at 12 hours post-infection. In addition, microcolonies were increasingly observed with time, being absent at 4 hours post-infection and predominant at 12 hours post-infection (Fig. 3).

Some degradation of infected villi was observed by light microscopy at 12 hours post-infection, detachment from the lamina propria of part of the epithelium or of the entire villus being observed for approximately 25 to 40% of villi.

Bacteria closely associated with the mucosal epithelium and effacement of the surrounding microvilli were observed as soon as 4 hours post-infection using SEM.

Furthermore, the presence of typical A/E lesions, as demonstrated by intimate-adherent bacteria, effacement of microvilli and pedestal formation, was confirmed using TEM as soon as 4 hours post-infection (Fig. 4).

A modulation of cytokine transcription was observed following infection of IVOC newborn pig intestinal explants with a PEPEC strain

Compared to non-infected explants, a significant transient increase in transcription of IL-4 ($p = 0.038$) was observed at 4 hours post-infection (Fig. 2b), thus in the early stages of villous colonization, microcolony formation, and development of A/E lesions. At 8 and 12 hours post-infection, as A/E lesions were developing and bacterial microcolonies were predominant, no difference in transcription of IL-4 was observed between infected and non-infected explants. On the other hand, an increase of IL-10 was observed for the infected explants from 8 hours post-infection, being significant ($p = 0.019$) at 12 hours post infection (Fig. 2c). An increase of IL-6 was observed in both infected and non-infected explants from 0 to 4 hours. A statistical trend was observed subsequently at 8 ($p = 0.083$) and 12 ($p = 0.087$) hours post-infection (Fig. 2d), the transcription of IL-6 decreasing for non-infected explants but remaining at the same high level for infected explants.

The difference in the transcription levels between infected and non-infected IVOC explants was not statistically significant or no trend was observed for the other tested cytokines. However, an increase of IL-1 β and a decrease of IL-18, although not significant, were observed at 12 hours post- infection when compared to non-infected explants.

Finally the ratio IL-8/IL-10 (pro-inflammatory/anti-inflammatory) was statistically lower ($p = 0.017$) for infected explants than for non-infected explants at 12 hours post-infection.

Discussion

It has previously been shown that the host immune status influences the development of A/E lesions in pigs (14). In the present study, using a porcine ileal IVOC model, we demonstrate that EPEC infection induced the expression of different cytokines depending on the time post-infection and the extent of lesions development. More precisely, a transient up-regulation of IL-4 mRNA was observed in the early stage of infection, at 4h post-infection, whereas an up-regulation of both IL-6 and IL-10 was observed later at 8 and 12h post-infection, when A/E lesions and bacterial microcolonies were more predominant.

These results suggest that there is a relationship between the stage of EPEC infection and the expression of different sets of cytokines. During the transient increase of IL-4, very few infected villi were observed whereas IL-4 was rapidly down-regulated when the proportion of infected villi increased. Few data on modulation of IL-4 expression during AEEC infection are available in the literature. Inhibition of IL-4 production following pre-treatment with EPEC lysate in intraepithelial and Peyer's patch lymphocytes isolated from mice has been reported (20). It was suggested that IL-4 may contribute to a balance between pro- and anti-inflammatory response to *Mycobacterium bovis* in infected cattle, where a peak in expression of pro-inflammatory cytokines and IL-4 were observed simultaneously (32).

It is generally accepted that an inflammatory response occurs following an AEEC infection. For example, a moderate inflammatory response with mild focal ulceration of the intestinal mucosa was observed after experimental infection of colostrum-deprived newborn pigs with a PEPEC strain (17). Ramirez *et al.* (24) demonstrated that REPEC activate in rabbit enterocytes the expression of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 β , TNF- α , IL-8, and IL-6, but stimulate only a slight increase in the anti-inflammatory

cytokine IL-10. Similarly, a stimulation of IL-6 and IL-10 after EPEC infection was observed in the current IVOC study. We also noted an up-regulation of IL-1 β during infection, but without statistical significance. In a post-weaning pig *in vivo* PEPEC model using the same strain as the one used in the current study, an increase of IL-1 β , IL-6, IL-12p40, but no modulation of IL-8, were found (14), IL-4 and IL-10 not being tested in this *in vivo* study.

Thus, results of the current IVOC study reinforce those of EPEC infections using *in vivo* models in suggesting that a balance between pro- and anti-inflammatory responses may play key role in AEEC infection, controlling and predicting clinical outcome. Ramirez *et al.* (24) suggested a Th1 immunological environment after REPEC infection, and that IL-6 and IL-1 β might be involved in the diarrhea produced by REPEC, the expression of these cytokines appearing to be up-regulated during the diminished expression of IL-10 caused by the intimin. Higgins *et al.* (18) reported that *C. rodentium*, a natural mice pathogen causing A/E lesions, also elicited a mucosal Th1 cytokine response in a mouse model, distinguished by up-regulation of IL-12, IFN- γ , and TNF- α . Using knockout mice, Simmons *et al.* (30) demonstrated that IL-12 and IFN- γ have a role in limiting bacterial infection in the colonic epithelium model. It should be noted that the cytokine analyses in the *in vivo* studies were performed at several days post-infection in contrast to a maximum of 12 hours in our IVOC model, making comparison of results difficult. Nevertheless, our results demonstrated that IL-6 and IL-10 were up-regulated in PEPEC-infected tissues within hours after bacterial contact, suggesting that the pro- and anti-inflammatory balance is triggered very early in the infection when the initial intimate bacterial attachment and microvillous effacement is taking place.

Several studies demonstrated the involvement of the multifunctional IL-6 in A/E-associated infection. IL-6 is known to play both pro-inflammatory and tissue repair roles (11). Eckmann (8) reported that IL-6 deficient mice were highly susceptible to *C.*

rodentium infection, demonstrating exaggerated tissue damage. Gibson *et al.* (11) suggested that IL-6 is a major cytoprotective factor expressed by host cells during *C. rodentium* infection. On the other hand, IL-10 is recognized as an anti-inflammatory cytokine, playing an important role in infection since it inhibits cytokine production and T-cell activation and terminates cell-mediated immune reactions (24). IL-10 is produced by Th2 cells, as IL-4, and both play an important role in antibody production and immunoregulation. Our results suggest that IL-10 may be an important mediator in the control of inflammation during AEEC infection in pigs and may contribute to the control of inflammation mediated by other cytokines since no significant up-regulation of pro-inflammatory cytokines, such as IL-12, IL-1 β , IFN- γ and IL-8, was observed. Furthermore, the significantly lower IL-8/IL-10 ratio observed for infected explants when compared with the non-infected explants at 12 hours post-infection supported the argument for an anti-inflammatory immune response. Thus, IL-6, as well as the immunoregulatory cytokines IL-4 and IL-10, have already been directly implicated in intestinal inflammation in literature. Hegde *et al.* (16) demonstrated a relation between the presence of IL-4 and IL-6 in the control of the inflammation process. They observed that, with the initial presence of IL-4 in the culture media of monocytes, IL-6 inhibited nuclear transcription factor (NF- κ B) binding activity in monocytes, suggesting a novel immunosuppressive activity of IL-6 (16). NF- κ B, in turn, activates the transcription of different pro-inflammatory cytokines and chemokines such as IL-1 β , IL-8 and TNF- α (21).

Up-regulation of IL-8 was observed in intestinal tissues after EPEC infection in rabbits (24) but not in EPEC infected pigs (14), nor in the present EPEC IVOC model or in mice infected with *C. rodentium* (15, 18). The role of the chemokine IL-8 in AEEC infection was first underlined using *in vitro* cell lines, such as T84 (15) and HT-29 (29), suggesting that the recruitment of inflammatory cells during AEEC infection may be in response to IL-8 secreted by epithelial cells infected by bacteria (26). However, recent *in vitro* studies suggest that the production of IL-8 is inversely proportional to the quantity of

EPEC associated with epithelial cells and that EPEC-induced inflammation is a balance between pro- and anti-inflammatory proteins (25, 29). On the other hand, it should be born in mind that results obtained in *in vitro* studies using epithelial cell lines might not reflect the complexity of host-pathogen interactions *in vivo*.

Differences observed between the results of the current study using IVOC tissues and those obtained using *in vivo* models might be explained by the fact that the former evaluated the very early stages in the infection, hours after infection instead of days after infection as in the latter. Furthermore, certain pathological steps of the bacterial infection, such as polymorphonuclear leukocyte recruitment in the lamina propria, may be limited in our IVOC explants, chemotaxis being an important process in inflammation. Finally, the *C. rodentium* mouse model might not be applicable to the EPEC situation in pigs, as *C. rodentium* colonizes the colon rather than the small intestine, and previous studies have demonstrated differences in the mucosal immune responses of the small and large intestines (2).

In conclusion, this study demonstrated that the IVOC model is a relevant model for the study of AEEC intestinal pathogen–host cell interactions, such as the cytokine response. The gradual development of A/E lesions with minimal tissue degradation allowed us to follow the temporal kinetics of the transcription of all the cytokines tested, in the presence and absence of bacterial infection. Our results suggest that there is a complex balance between the pro- and anti-inflammatory responses during AEEC infection, characterized in the current IVOC model by a transient up-regulation of IL-4 followed by up-regulation of IL-10 and IL-6, early in the infection of pig ileal explants.

Acknowledgements

We thank Brigitte Lehoux and Jade-Pascale Prévost Lemyre for their technical assistance; Guy Beauchamp for statistical analysis; Céline Lussier for transmission electron microscopy; and Diane Montpetit for scanning electron microscopy.

This work was supported by grant 2294 to J. M. Fairbrother from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC).

References

1. **Beaudry, M., C. Zhu, J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**:144-148.
2. **Camerini, V., C. Panwala, and M. Kronenberg.** 1993. Regional specialization of the mucosal immune system. Intraepithelial lymphocytes of the large intestine have a different phenotype and function than those of the small intestine. *J Immunol* **151**:1765-1776.
3. **Cantey, J. R., and R. K. Blake.** 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis* **135**:454-462.
4. **Chen, H. D., and G. Frankel.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**:83-98.
5. **Collington, G. K., I. W. Booth, and S. Knutton.** 1998. Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection. *Gut* **42**:200-207.
6. **Darwich, L., S. Pie, A. Rovira, J. Segales, M. Domingo, I. P. Oswald, and E. Mateu.** 2003. Cytokine mRNA expression profiles in lymphoid tissues of pigs naturally affected by postweaning multisystemic wasting syndrome. *J Gen Virol* **84**:2117-2125.
7. **Dozois, C. M., E. Oswald, N. Gautier, J. P. Serthelon, J. M. Fairbrother, and I. P. Oswald.** 1997. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Veterinary immunology and immunopathology* **58**:287-300.
8. **Eckmann, L.** 2006. Animal models of inflammatory bowel disease: lessons from enteric infections. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**:28-38.
9. **Fairbrother, J. M., and E. Nadeau.** 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech* **25**:555-569.

10. **Fairbrother, J. M., E. Nadeau, and C. L. Gyles.** 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**:17-39.
11. **Gibson, D. L., C. Ma, C. M. Rosenberger, K. S. Bergstrom, Y. Valdez, J. T. Huang, M. A. Khan, and B. A. Vallance.** 2007. Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cell Microbiol.*
12. **Girard, F., I. Batisson, G. M. Frankel, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 2005. Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. *Infection and immunity* **73**:6005-6016.
13. **Girard, F., I. Batisson, G. Martinez, C. Breton, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 2006. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* **46**:340-350.
14. **Girard, F., I. P. Oswald, I. Taranu, P. Helie, G. D. Appleyard, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 2005. Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. *Infection and immunity* **73**:5514-5523.
15. **Gobert, A. P., K. T. Wilson, and C. Martin.** 2005. Cellular responses to attaching and effacing bacteria: activation and implication of the innate immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* **53**:234-244.
16. **Hegde, S., J. Pahne, and S. Smola-Hess.** 2004. Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *Faseb J* **18**:1439-1441.
17. **Helie, P., M. Morin, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infection and immunity* **59**:814-821.

18. **Higgins, L. M., G. Frankel, G. Douce, G. Dougan, and T. T. MacDonald.** 1999. *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infection and immunity* **67**:3031-3039.
19. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-140.
20. **Malstrom, C., and S. James.** 1998. Inhibition of murine splenic and mucosal lymphocyte function by enteric bacterial products. *Infection and immunity* **66**:3120-3127.
21. **McDonald, P. P., A. Bald, and M. A. Cassatella.** 1997. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* **89**:3421-3433.
22. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
23. **Pie, S., J. P. Lalles, F. Blazy, J. Laffitte, B. Seve, and I. P. Oswald.** 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* **134**:641-647.
24. **Ramirez, K., R. Huerta, E. Oswald, C. Garcia-Tovar, J. M. Hernandez, and F. Navarro-Garcia.** 2005. Role of EspA and intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. *Infection and immunity* **73**:103-113.
25. **Ruchaud-Sparagano, M. H., M. Maresca, and B. Kenny.** 2007. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. *Cell Microbiol* **9**:1909-1921.
26. **Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht.** 1997. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *The American journal of physiology* **273**:C1160-1167.

27. **Savkovic, S. D., J. Villanueva, J. R. Turner, K. A. Matkowskyj, and G. Hecht.** 2005. Mouse model of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infection and immunity* **73**:1161-1170.
28. **Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Blikslager, K. Tedin, and L. H. Wieler.** 2006. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**:293-305.
29. **Sharma, R., S. Tesfay, F. L. Tomson, R. P. Kanteti, V. K. Viswanathan, and G. Hecht.** 2006. Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G685-694.
30. **Simmons, C. P., N. S. Goncalves, M. Ghaem-Maghami, M. Bajaj-Elliott, S. Clare, B. Neves, G. Frankel, G. Dougan, and T. T. MacDonald.** 2002. Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial pathogen, *Citrobacter rodentium*, in mice lacking IL-12 or IFN-gamma. *J Immunol* **168**:1804-1812.
31. **Solano Aguilar, G. I., E. Beshah, K. G. Vengroski, D. Zarlenga, L. Jauregui, M. Cosio, L. W. Douglass, J. P. Dubey, and J. K. Lunney.** 2001. Cytokine and lymphocyte profiles in miniature swine after oral infection with *Toxoplasma gondii* oocysts. *Int J Parasitol* **31**:187-195.
32. **Thacker, T. C., M. V. Palmer, and W. R. Waters.** 2007. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Veterinary immunology and immunopathology* **119**:204-213.
33. **Tzipori, S., F. Gunzer, M. S. Donnenberg, L. de Montigny, J. B. Kaper, and A. Donohue-Rolfe.** 1995. The role of the eaeA gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infection and immunity* **63**:3621-3627.

34. **Wales, A. D., M. J. Woodward, and G. R. Pearson.** 2005. Attaching-effacing bacteria in animals. *J Comp Pathol* **132**:1-26.
35. **Williams, P. P.** 1993. Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostrum leukocytes by neonatal pigs. *Can J Vet Res* **57**:1-8.
36. **Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Donnenberg, M. Beaudry, and J. M. Fairbrother.** 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**:4153-4159.
37. **Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1995. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* **59**:118-123.

Figure Legend

Figure 1. Representative graph of cytokine mRNA expression during the incubation of non-infected newborn ileal pig explants. Values were normalized with respect to the mRNA levels of the cyclophilin gene. Results are expressed as means for quadruplicate experiments from four independent pigs. Error bars indicate standard deviations. A *P* value of ≤ 0.05 was taken to be significant (*).

Figure 2. A) Relative proportion of villi with bacteria adhering to intact epithelium on intestinal IVOC explants. Results are expressed as means from two representative IVOC experiments using indirect immunofluorescence. Cytokine mRNA expression for B) IL-4, C) IL-10, and D) IL-6 in explants during PEPEC infection using a newborn pig ileal IVOC model. Open square: non-infected explants. Closed square: infected explants. Values were normalized with respect to the mRNA levels of the cyclophilin gene. Results are expressed as means for quadruplicate experiments from four independent piglets. Error bars indicate standard deviations. *P* values of ≤ 0.05 are taken to be significant (*), whereas *P* values of ≤ 0.1 are taken to indicate a trend (▼).

Figure 3. IFA micrograph showing attachment of individual bacteria (open arrow) and formation of microcolonies (closed arrow) of the PEPEC strain ECL 1001 on the epithelial cell layer of a villus in a porcine ileal explant at 12 hours post-infection (magnification, X400).

Figure 4. TEM micrograph showing intimate attachment of bacteria (arrow) with effacement of the microvilli at the site of bacterial adherence, after inoculation of a porcine ileal explant with the PEPEC strain ECL 1001 (magnification, X15,000).

Figure 1

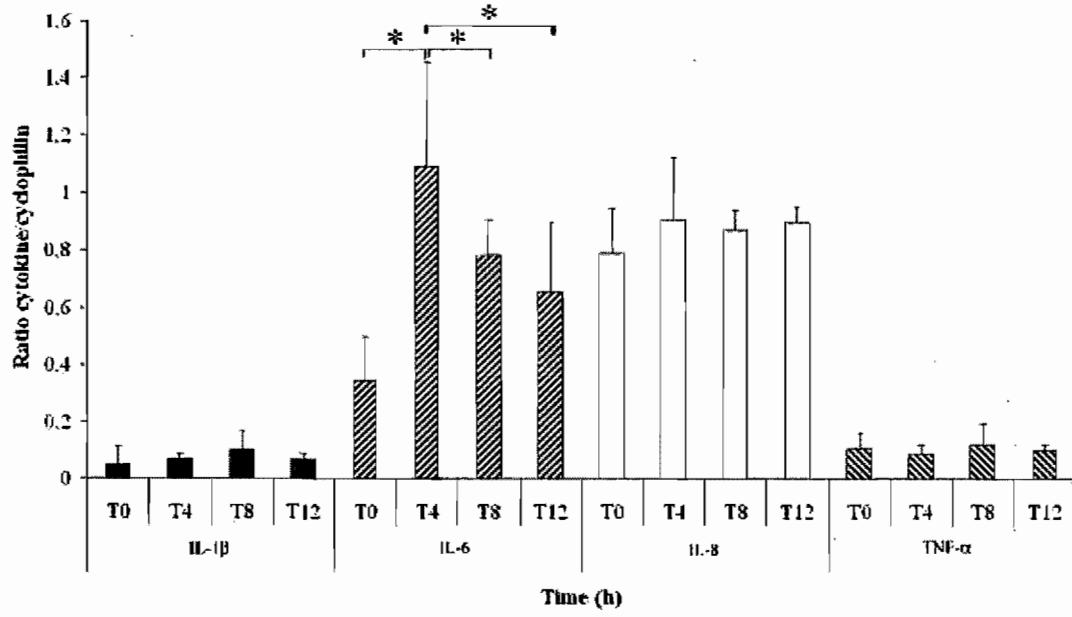


Figure 2

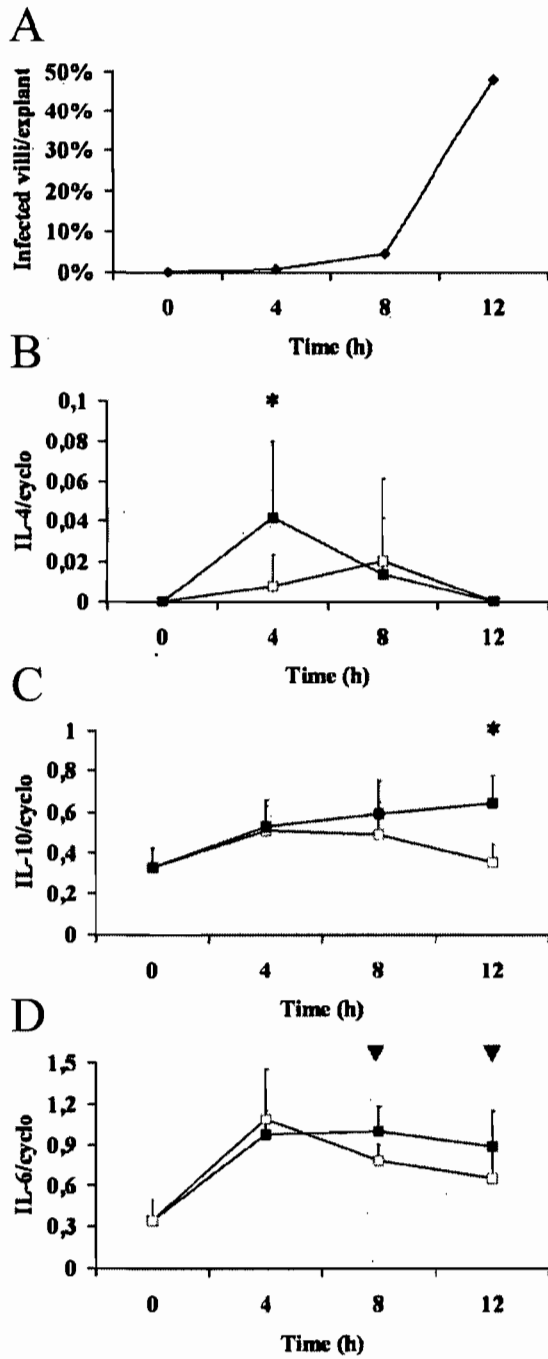


Figure 3

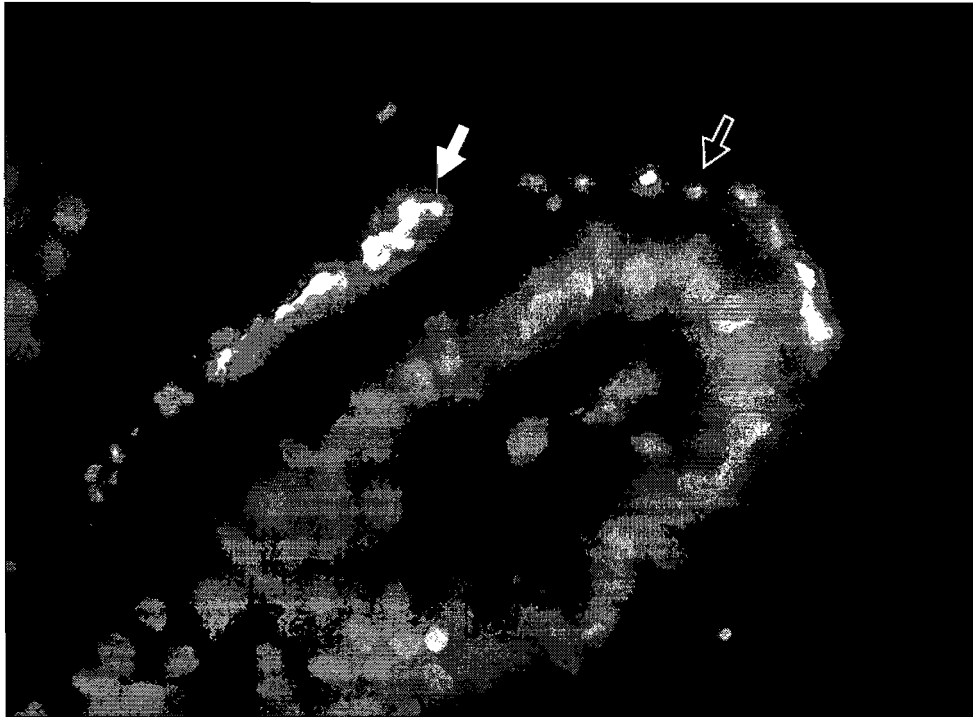


Figure 4



Table 1

Table 1: Oligonucleotide primers and conditions used for RT-PCR

Gene and Primers ^a	Sequence of primers (5'-3')	Annealing temp (°C)	No. of cycles	Reference or source
IL-1 β	F AAA-GGG-GAC-TTG-AAG-AGA-G	59	27	(7)
	R CTG-CTT-GAG-AGG-TGC-TGA-TGT			
IL-4	F TAC-CAG-CAA-CTT-CGT-CCA-C	64	33	(7)
	R ATC-GTC-TTT-AGC-CTT-TCC-AA			
IL-6	F ATG-AAC-TCC-CTC-TCC-ACA-AGC	65	36	(7)
	R TGG-CTT-TGT-CTG-GAT-TCT-TTC			
IL-8	F TTT-CTG-CAG-CTC-TCT-GTG-AGG	62	33	(7)
	R CTG-CTG-TTG-TTG-TTG-CTT-CTC			
IL-10	F GCA-TCC-ACT-TCC-CAA-CCA	60	33	(7)
	R CTT-CCT-CAT-CTT-CAT-CGT-CAT			
IL-12p40	F GAT-GCT-GGC-CAG-TAC-ACC-TG	65	32	(31)
	R CCT-GAT-GAA-GAA-GCT-GCT			
IL-18	F TAT-GCC-TGA-TTC-TGA-CTG-TT	54	30	(23)
	R ATG-AAG-ACT-CAA-ACT-GTA-TCT			
TNF- α	F ATC-GGC-CCC-CAG-AAG-GAA-GAG	66	27	(7)
	R GAT-GGC-AGA-GAG-GAG-GTT-GAC			
INF- γ	F GAA-GAA-AGG-TCA-GCC-AAG-CGC	64	33	(6)
	R GCT-TGA-TCA-CAT-CCA-TGC-TCC			
Cyclophilin	F TAA-CCC-CAC-CGT-CTT-CTT	58	30	(7)
	R TGC-CAT-CCA-ACC-ACT-CAG			

^a F, forward; R, reverse

Discussion & Conclusion

L'hypothèse de ce projet de maîtrise était que tel qu'observé *in vivo*, l'infection de tissus intestinaux d'origine porcine par une souche PEPEC génère des patrons cytokinaires particuliers. Afin de vérifier cette hypothèse, l'objectif principal était d'étudier la cinétique de la réponse cytokinaire dans un modèle de culture *in vitro* de tissus intestinaux (*in vitro* organe culture ou IVOC) en relation avec le développement des lésions de type A/E lors d'une infection par une souche PEPEC.

Le modèle IVOC d'iléon porcin préalablement développé dans notre laboratoire pour étudier la colonisation des PEPEC et les lésions de type A/E (Girard *et al.*, 2005a) a d'abord dû être adapté pour permettre l'évaluation de la cinétique de la réponse cytokinaire. Pour ce faire, nous devons diminuer la dégradation des tissus à la suite de l'infection, augmenter la longévité des explants infectés afin d'évaluer les réponses cytokinaires hâtives et plus tardives, et finalement, obtenir une évolution de la colonisation et du développement des lésions de type A/E générées par la souche PEPEC. Tout d'abord, une échelle de la dégradation des explants basée sur la quantité relative de villosités et/ou de l'épithélium détachés par explant a été mise en place pour évaluer de façon semi-quantitative la dégradation des tissus. L'échelle est composée de sept niveaux de dégradation selon une appréciation visuelle de coupes histologiques des explants colorées au HPS (Annexe Figure 1 et Annexe Tableau I). Pour le développement d'un modèle IVOC porcin adéquat pour le projet, notre technique de référence (Girard *et al.*, 2005a) a été modifiée, notamment en évaluant l'impact du nombre d'infections, de la dose infectieuse, de la période de temps post-infection, de différentes conditions d'atmosphère et de la fréquence de changement de milieu sur le développement des lésions de type A/E et l'intégrité des explants. Le protocole final décrit dans l'article permet un développement graduel des lésions avec un minimum de dégradation des tissus jusqu'à 16 heures suite à l'infection, soit une période de temps jugée satisfaisante pour l'étude de la cinétique de la réponse cytokinaire et de l'infection associées aux PEPEC.

La technique IVOC, telle qu'utilisée dans notre laboratoire, permet la culture d'un grand nombre d'explants, permettant ainsi de tester différentes conditions expérimentales sur des tissus provenant d'un même intestin. Cela nous permet de réduire les variations inter-individu et inter-essai. Lors des premiers tests, en utilisant les mêmes conditions que Girard *et al.* (2005), soit 3 infections consécutives à 1 heure d'intervalle avec une forte dose de PEPEC, nous avons observé que les lésions et la dégradation était très importantes dès 4 h suivant l'infection. En réduisant d'abord le nombre d'infections à une seule, puis en diminuant la concentration de PEPEC dans l'infection, nous avons minimisé la dégradation du tissu et favorisé un développement graduel des lésions. L'utilisation d'une dose infectieuse faible et unique correspond davantage aux conditions infectieuses réelles sur la ferme, où le porc entre en contact d'abord avec une faible concentration de PEPEC pour ensuite se multiplier dans l'intestin. De plus, la faible quantité de bactéries utilisées sur un explant donné correspond probablement davantage à ce qui est observé lors d'une infection naturelle sur une ferme, c'est-à-dire que seule une petite quantité de bactéries se retrouve à un point précis de la surface intestinale lors de l'infection.

Le modèle a été par la suite peaufiné afin d'augmenter le taux de lésions de type A/E, notamment à la fin de la période d'incubation. Pour ce faire, nous avons d'abord substitué l'atmosphère de 95 % O₂ et 5 % CO₂ par une atmosphère de 5 % CO₂ et air. Baehler et Moxley (2002) rapportaient une hausse du nombre de lésions de type A/E dans un modèle d'explants bovin lors d'incubation en condition 5 % CO₂. Finalement, les milieux ont été changés aux 2 heures plutôt qu'à chaque heure. Ces dernières modifications nous ont finalement permis d'atteindre la première partie de notre premier objectif, soit de développer un modèle IVOC d'infection à AEEC dont le niveau de lésions augmente

graduellement dans le temps pour atteindre un taux satisfaisant de lésions avec un minimum de dégradation des tissus.

Dans un deuxième temps, il fallait tester si l'on pouvait observer la transcription de l'ARNm des cytokines dans le nouveau modèle IVOC d'infection à AEEC. Au meilleur de nos connaissances, l'étude des cytokines à partir de culture d'intestins d'origine porcine n'était pas décrite dans la littérature au début de notre projet. Le choix des cytokines, donc celles provenant des groupes dits pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8 et TNF- α), Th1 (IL-18 et INF- γ) et Th2 (IL-4 et IL-10) a été basé d'abord sur les résultats d'études *in vivo* d'infection aux AEEC retrouvées dans la littérature, afin d'avoir une vue globale de la réponse cytokinaire. Il est à noter qu'IL-4 et IL-10 sont aussi considérées comme des cytokines anti-inflammatoires.

Le fait d'observer la transcription de toutes les cytokines testées dans les explants non infectés suggérait que la technique d'IVOC intestinale du porc avait un grand potentiel pour l'étude de la réponse immunitaire muco-sale intestinale. De plus, tel que décrit dans notre article, des modulations de l'expression de certaines cytokines en association avec le développement des lésions de type A/E ont été observées à la suite de l'infection avec la souche PEPEC, confirmant le potentiel de ce modèle pour l'étude de l'interaction hôte-pathogène au niveau de l'intestin. Sur les huit cytokines testées, trois ont démontré une variation suite à l'infection, soit l'IL-4 à 4 h post-infection, l'IL-6 à 8 et 12 h post-infection, et l'IL-10 à 12 h post-infection. De plus, le ratio de IL-8/IL-10 était plus faible dans les explants infectés que dans les explants non infectés à 12 heures suivant l'infection.

Il est généralement accepté qu'une réponse inflammatoire se développe à la suite d'une infection par les AEEC. Par exemple, une réponse inflammatoire modérée avec de légères ulcérations au niveau de la muqueuse intestinale a été observée suite à l'infection expérimentale de porcelets nouveaux-nés privés de colostrum par une souche PEPEC (Hélie *et al.*, 1991). Les résultats de notre étude suggèrent qu'il existe une relation entre l'évolution de l'infection par une souche PEPEC et le niveau de transcription de différentes cytokines. En effet, durant la hausse transitoire de l'IL-4, il y avait très peu de villosités infectées, tandis que son niveau a rapidement diminué lorsque la proportion de villosités infectées était plus élevée. Il n'existe que peu d'information sur la modulation de l'expression de l'IL-4 durant une infection aux AEEC dans la littérature. La seule étude associée aux AEEC rapporte une diminution dans la production d'IL-4 par des lymphocytes murins intra-épithéliaux et ceux des PP suite au prétraitement des lymphocytes par un lysat d'une souche EPEC (Malstrom et James, 1998). Néanmoins, l'IL-4 pourrait contribuer à la balance entre la réponse pro- et anti-inflammatoire lors d'une infection puisqu'une hausse dans l'expression de l'IL-4 a été observée en même temps que la hausse de cytokines pro-inflammatoires chez le bovin infecté par *Mycobacterium bovis* (Thacker *et al.*, 2007).

Ramirez *et al.* (2005) rapportaient aussi la stimulation d'une combinaison de cytokines pro- et anti-inflammatoires lors d'une infection par une souche REPEC chez le lapin. Plus précisément, ils ont démontré qu'une souche REPEC activait l'expression de cytokines pro-inflammatoires, telles que IL-1 β , TNF- α , IL-8 et IL-6 et de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 dans les entérocytes de lapins (Ramirez *et al.*, 2005). Similairement, nous avons observé une augmentation d'IL-6 et IL10 suite à l'infection des IVOC par notre souche PEPEC, cette augmentation se présentant à la suite de la diminution rapide d'IL-4. De plus, comme pour Ramirez *et al.* (2005), nous avons noté une hausse de l'IL-1 β , mais non significative. Dans le modèle IVOC intestinal porcin avec la souche de *Salmonella enterica*, les auteurs ont observé une hausse de l'IL-1 β ainsi que de l'IL-8 suite à l'adhésion

et l'internalisation de la souche (Hyland *et al.*, 2006). Dans une étude *in vivo* chez des porcs nouvellement sevrés, utilisant la même souche PEPEC que celle utilisée dans notre étude, une hausse dans la transcription des IL-1 β , IL-6 et IL-12p40, mais aucune modification d'IL-8, a pu être observée (Girard *et al.*, 2005b). Par contre, les IL-4 et IL-10 n'avaient pas été évaluées dans cette étude. De récentes études *in vitro* suggèrent aussi que l'inflammation induite par les EPEC est une résultante de la balance entre les protéines pro- et anti-inflammatoires (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2007; Sharma *et al.*, 2006).

Les résultats obtenus dans notre modèle IVOC supportent les résultats des études *in vivo* lors d'infection avec une souche EPEC, suggérant qu'une balance pro- et anti-inflammatoire entre en jeu lors des infections aux AEEC. Ramirez *et al.* (2005) ont suggéré que l'infection à REPEC engendre une réponse immunologique de type Th1 et que l'IL-6 et l'IL-1 β seraient impliquées dans le processus de la diarrhée induite par les REPEC. L'expression des cytokines IL-6 et IL-1 β serait augmentée à la suite de la diminution de l'expression de l'IL-10 causée par l'intimisation des REPEC. Une induction d'une réponse Th1 a aussi été observée lors d'une infection à *C. rodentium* chez la souris (Higgins *et al.*, 1999).

Nos résultats démontrent que l'induction de cytokines, telles que l'IL-6 (pro-inflammatoire) et IL-10 (anti-inflammatoire), se manifeste très rapidement à la suite de l'infection par une souche PEPEC, soit quelques heures seulement après l'infection des explants. Ceci suggère que la balance pro- et anti-inflammatoire serait activée très tôt lors de l'infection, soit dès que la bactérie entre en contact intime avec l'épithélium et que les lésions de type A/E se développent.

Plusieurs études ont démontré la plurifonctionnalité de l'IL-6 dans les infections liées aux lésions de type A/E. L'IL-6 est connue pour jouer un rôle tant au niveau pro-inflammatoire qu'au niveau de la réparation des tissus (Gibson *et al.*, 2007). Eckman a rapporté que des souris déficientes en IL-6 étaient beaucoup plus susceptibles à une infection à *C. rodentium* et présentaient des dommages tissulaires sévères (Eckmann, 2006), suggérant que l'IL-6 était un facteur de protection tissulaire exprimé par les cellules hôtes lors d'une infection à *C. rodentium* (Gibson *et al.*, 2007). D'un autre côté, l'IL-10 est reconnue comme étant une cytokine anti-inflammatoire qui joue un rôle important dans l'infection, car elle inhibe la production de cytokines et l'activation des lymphocytes T (Ramirez *et al.*, 2005). L'IL-10 est produite par les cellules dites Th2, tout comme IL-4, et les deux jouent un rôle important dans la régulation immunitaire. Nos résultats suggèrent que l'IL-10 est un médiateur important dans le contrôle de l'inflammation suite à l'infection par une souche AEEC chez le porc. Elle contribuerait au contrôle de l'inflammation générée par les autres cytokines, tel que suggéré dans notre étude par l'absence de la stimulation de la transcription des cytokines dites pro-inflammatoires (IL-12p40, IL-1 β , TNF- α et IL-8) après infection.

Herbeuval et son équipe ont démontré que l'IL-6 produite par les macrophages induit la production d'IL-10 par des cellules du côlon (Herbeuval *et al.*, 2004). L'absence de hausse dans la transcription des cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines (IL-1 β , IL-8 et TNF- α) et la hausse d'IL-6, de même que la cinétique temporelle observée dans notre modèle pour IL-6 et IL-10, supportent cette hypothèse. Cependant, de plus amples études sont nécessaires afin de confirmer un lien direct entre la présence d'IL-6 et d'IL-10.

Il a été suggéré que l'IL-6 pourrait aussi avoir des actions anti-inflammatoires, notamment en présence préalable d'IL-4. Hedge *et al.* (2004) rapportaient que l'IL-6 inhiberait le facteur de transcription NF- κ B dans les monocytes lors de la présence initiale d'IL-4 dans le milieu de culture des monocytes (Hegde *et al.*, 2004). Dans le même ordre d'idée, il a été démontré que les STEC, et par extension les autres AEEC, inhibent NF- κ B activement durant l'infection, ayant pour conséquence la diminution de l'expression des cytokines pro-inflammatoires (Hauf et Chakraborty, 2003). Sharma *et al.* (2006) démontraient d'ailleurs que l'activité anti-inflammatoire était directement liée à un T3SS fonctionnel. Le facteur NF- κ B est reconnu comme étant un activateur de la transcription de différentes cytokines pro-inflammatoires et chimiokines telles que l'IL-1 β , IL-8 et TNF- α (McDonald *et al.*, 1997). La stimulation hâtive d'IL-4, puis des IL-6 et IL-10 observée dans notre étude, suggère une stimulation d'une réponse anti-inflammatoire importante lors d'infection des tissus intestinaux d'origine porcine par une souche PEPEC, cette réponse pouvant être décisive dans l'issue de l'infection.

La hausse de l'IL-8 observée dans les tissus intestinaux suite à l'infection par des REPEC chez les lapins (Ramirez *et al.*, 2005) et l'infection par *Salmonella enterica* dans le modèle IVOC intestinal porcine (Hyland *et al.*, 2006), n'ont pas été observées chez les porcelets infectés par des PEPEC (Girard *et al.*, 2005b), chez les souris infectées par *C. rodentium* (Gobert *et al.*, 2005 et Higgins *et al.*, 1999), ni dans notre étude utilisant une souche PEPEC dans un modèle IVOC porcine. Le rôle potentiel de la chimiokine IL-8 dans les infections aux AEEC a d'abord été décrit dans les études *in vitro* utilisant des lignées cellulaires, telles T84 (Gobert *et al.*, 2005) et HT-29 (Sharma *et al.*, 2006). Ces études suggéraient que le recrutement des cellules inflammatoires durant l'infection des AEEC était en réponse à la sécrétion d'IL-8 par les cellules épithéliales infectées par les bactéries (Savkovic *et al.*, 1997).

De récentes études *in vitro* suggèrent que la production d'IL-8 est inversement proportionnelle à la quantité d'EPEC présente sur les cellules épithéliales (Ruchaud-Sparagano *et al.*, 2007 et Sharma *et al.*, 2006). De plus, il a été démontré que l'expression d'IL-8 était inhibée, comme celle des cytokines pro-inflammatoires, par les AEEC, notamment par la suppression de l'activation de NF- κ B (Hauf et Chakraborty, 2003). Il faut cependant garder en mémoire que les résultats sur IL-8 ont été obtenus lors d'études *in vitro* utilisant des lignées cellulaires, ces dernières ne reflétant pas la complexité des interactions *in vivo* entre le pathogène et son hôte. Cependant, les résultats de ces études peuvent orienter et guider la formulation d'hypothèses d'études *in vivo*.

Il est important de noter que la comparaison des résultats de réponse cytokinaire aux infections peut être difficile entre les différentes études, les modèles, les techniques d'analyses des cytokines et les designs expérimentaux variant d'une étude à l'autre. Dans notre modèle IVOC, l'évaluation de la réponse immunitaire s'est effectuée très tôt dans le processus de l'infection, soit après quelques heures, tandis qu'elle a été évaluée plusieurs jours après l'infection dans les modèles *in vivo*. De plus, certains processus inhérents à la pathogénie des EPEC, tels que le recrutement des cellules inflammatoires au site d'infection, sont quasi inexistantes dans nos explants d'IVOC. Finalement, le modèle murin de *C. rodentium* peut ne pas être totalement représentatif des infections aux EPEC chez le porc, les EPEC porcins colonisant l'intestin grêle, tandis que *C. rodentium* colonise le côlon et engendre une pathologie différente. Des différences dans la réponse immunitaire entre les petits et gros intestins ont été rapportées (Camerini *et al.*, 1993).

Néanmoins, plusieurs études *in vivo* ainsi que notre étude utilisant un modèle IVOC suggèrent une balance entre la réponse pro-inflammatoire et anti-inflammatoire au niveau de l'intestin lors d'infections aux AEEC. Fait intéressant, nos résultats suggèrent que cette balance cytokinaire s'initie très rapidement dans l'infection d'une souche EPEC chez le porc, soit dès les premières heures après l'infection. Ceci démontre que la technique IVOC utilisant des explants intestinaux de porc est un outil très intéressant pour l'étude de cinétique de la réponse immunitaire suite à l'infection par une souche causant des lésions de type A/E.

Le développement de ce modèle pour l'étude de l'interaction hôte-pathogène ouvre maintenant la porte à différents travaux futurs. Tout d'abord, il serait intéressant d'étudier la réponse cytokinaire avant 4 heures et après 12 heures d'infection afin de vérifier l'évolution de la réponse cytokinaire hors de cette période d'observation. Aussi, la réponse cytokinaire pourrait être évaluée pour d'autres régions intestinales telles que le jéjunum, le côlon et/ou le rectum afin de vérifier la différence de réponse cytokinaire. De plus, le modèle IVOC s'applique très bien à d'autres méthodes d'analyses, telles que l'hybridation *in situ* qui permettrait de cibler les régions intestinales et les cellules impliquées dans les réponses cytokinaires; ainsi que l'immunofluorescence et l'ELISA qui permettraient d'évaluer l'expression et la sécrétion des différentes cytokines. Également, d'autres types d'AEEC pourraient être étudiés, tels que les souches EHEC O157:H7, et l'on pourrait comparer la réponse obtenue avec celles des études antérieures. Le modèle IVOC a par ailleurs déjà été utilisé pour le développement des lésions A/E par des AEEC de différentes origines, incluant les souches O157:H7 (Girard *et al.*, 2005a).

De plus, ce modèle serait intéressant pour étudier l'impact des cytokines sur l'infection et, à l'inverse, l'impact des différents facteurs de virulence de la bactérie sur la

réponse cytokinaire. Il serait possible d'approfondir l'étude de l'effet de la réponse anti-inflammatoire obtenue lors d'infections aux AEEC par l'ajout d'anticorps spécifiques neutralisant les cytokines. Par exemple, il serait intéressant d'observer si nous pourrions influencer la sévérité des lésions par le blocage de l'IL-10 ou par l'ajout de cytokines recombinantes. De plus, il serait possible d'étudier l'implication de chaque cytokine dans la production des lésions de type A/E par l'ajout de cytokines recombinantes et d'anticorps anti-cytokines. Par exemple, en ajoutant de l'IL-4, il serait intéressant de regarder si l'on peut retarder l'apparition des lésions de type A/E et/ou varier la transcription d'IL-6 ou du facteur NF- κ B, tel que suggéré par Hegde *et al.* (2004). Finalement, l'étude de la réponse cytokinaire évaluée lors d'infection avec différents mutants de souches AEEC permettrait d'étudier l'implication des différents facteurs de virulence bactériens dans la réponse cytokinaire. Tout cela permettrait de renforcer nos hypothèses sur le rôle de chacune des cytokines dans notre modèle.

En conclusion, l'objectif principal de cette étude, qui était d'étudier la réponse cytokinaire dans le modèle IVOC lors d'une infection aux AEEC, a été atteint du fait que les deux objectifs secondaires, qui étaient d'adapter la méthode IVOC décrite par Girard *et al.* (2005a) et d'étudier la cinétique de la production cytokinaire en relation avec la cinétique de l'infection avec une souche PEPEC, ont été accomplis avec succès. Grâce à cette étude, nous possédons maintenant un nouveau modèle pour l'étude de la réponse cytokinaire suite aux infections aux AEEC qui permettra de mieux caractériser les interactions hôte-pathogène et de mieux comprendre comment l'hôte réagit face à ces pathogènes opportunistes. Finalement, ce projet nous a permis d'observer une balance pro- et anti-inflammatoire caractérisée par la stimulation des cytokines IL-4, IL-6 et IL-10 à la suite de l'infection avec une souche PEPEC chez le porc, cette balance s'activant dès les premières heures suivant l'infection.

Bibliographie

- Azevedo, M. S., L. Yuan, S. Pouly, A. M. Gonzales, K. I. Jeong, T. V. Nguyen, and L. J. Saif.** 2006. Cytokine responses in gnotobiotic pigs after infection with virulent or attenuated human rotavirus. *J virol* **80**:372-382.
- Batissou, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques and J. Harel.** 2003. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(8): 4516-25.
- Baehler, A. A., and R. A. Moxley.** 2002. Effect of culture conditions on *Escherichia coli* O157:H7-mediated attaching-effacing lesions in a bovine large intestinal mucosal explant model. *FEMS Microbiol Lett* **212**: 107-110.
- Beaudry, M., C. Zhu, J. M. Fairbrother, and J. Harel.** 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**:144-148.
- Camerini, V., C. Panwala, and M. Kronenberg.** 1993. Regional specialization of the mucosal immune system. Intraepithelial lymphocytes of the large intestine have a different phenotype and function than those of the small intestine. *J Immunol* **151**:1765-1776.
- Cantey, J. R., and R. K. Blake.** 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis* **135**:454-462.
- Center for Disease Control and Prevention.** Site Internet.
www.cdc.gov/ecoli/2006/september/updates/100606.htm

- Chapman, T. A., X. Y. Wu, I. Barchia, K. A. Bettelheim, S. Driesen, D. Trott, M. Wilson, and J. J. Chin.** 2006. Comparison of virulence gene profiles of *Escherichia coli* strains isolated from healthy and diarrheic swine. *Applied and environmental microbial* **72**:4782-4795.
- Chen, H. D., and G. Frankel.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev* **29**:83-98.
- Cope Cytokines & Cells Online Pathfinder Encyclopaedia.** Site Internet. www.copewithcytokines.de/.
- de Jesus, M. C., A. A. Urban, M. E. Marasigan, and D. E. Barnett Foster.** 2005. Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipi receptor binding specificity. *J Infect Dis* **192**:1430-1440.
- Dibb-Fuller, M. P., A. Best, D. A. Stagg, W. A. Cooley, and M. J. Woodward.** 2001. An *in-vitro* model for studying the interaction of *Escherichia coli* O157:H7 and other enteropathogens with bovine primary cell cultures. *J med microbiol* **50**:759-769
- Eckmann, L.** 2006. Animal models of inflammatory bowel disease: lessons from enteric infections. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1072**:28-38.
- Fairbrother, J. M., and E. Nadeau.** 2006. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech* **25**:555-569.

- Fairbrother, J. M., E. Nadeau, and C. L. Gyles.** 2005. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* 6:17-39.
- Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper and S. Knutton.** 1998. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* 30(5): 911-21.
- Frydendani, K.** 2002. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. *Vet Microbiol* 85:169-182.
- Garmendia, J., G. Frankel and V. F. Crepin.** 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* 73(5): 2573-85.
- Gibson, D. L., C. Ma, C. M. Rosenberger, K. S. Bergstrom, Y. Valdez, J. T. Huang, M. A. Khan, and B. A. Vallance.** 2008. Toll-like receptor 2 plays a critical role in maintaining mucosal integrity during *Citrobacter rodentium*-induced colitis. *Cell Microbiol.* 10(2):388-403
- Girard, F., I. Batisson, G. M. Frankel, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 2005a. Interaction of enteropathogenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and porcine intestinal mucosa: role of intimin and Tir in adherence. *Infect Immun* 73:6005-6016.
- Girard, F., I. Batisson, G. Martinez, C. Breton, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 2006. Use of virulence factor-specific egg yolk-derived immunoglobulins as a promising

alternative to antibiotics for prevention of attaching and effacing *Escherichia coli* infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 46:340-350.

- Girard, F., I. P. Oswald, I. Taranu, P. Helie, G. D. Appleyard, J. Harel, and J. M. Fairbrother.** 2005b. Host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. *Infect Immun* 73:5514-5523.
- Gobert, A. P., K. T. Wilson, and C. Martin.** 2005. Cellular responses to attaching and effacing bacteria: activation and implication of the innate immune system. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 53:234-244.
- Gyles, C. L. and J. M. Fairbrother.** 2004. *Escherichia coli*. Pathogenesis of bacterial infections in animals. C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer and C. O. Thoen, Blackwell Publishing Ltd.: 193-223.
- Hauf, N. and T. Chakraborty.** 2003. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Immunol* 170(4): 2074-82.
- Hegde, S., J. Pahne, and S. Smola-Hess.** 2004. Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *Faseb J* 18:1439-1441.
- Helie, P., M. Morin, M. Jacques, and J. M. Fairbrother.** 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infect Immun* 59:814-821.

- Herbeuval, J. P., E. Lelievre, C. Lambert, M. Dy, and C. Genin.** 2004. Recruitment of STAT3 for production of IL-10 by colon carcinoma cells induced by macrophage-derived IL-6. *J Immunol* **172**:4630-4636.
- Higgins, L. M., G. Frankel, G. Douce, G. Dougan, and T. T. MacDonald.** 1999. *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect immun* **67**:3031-3039.
- Hyland, K. A., D. R. Brown, and M. P. Murtaugh.** 2006. *Salmonella enterica* serovar Choleraesuis infection of the porcine jejunal Peyer's patch rapidly induces IL-1beta and IL-8 expression. *Vet Immunol Immunopath* **109**:1-11.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-140.
- Kuby, J., R. A. Goldsby, T. J. Kindt, and B. A. Osborne.** 2001. *Immunologie : le cours de Janis Kuby : avec questions de révision.* Dunod, Paris, 688 pages.
- Macdonald, T. T., and Monteleone.** 2005. Immunity, inflammation, and allergy in the gut. *Science* **307**:1920-1925.
- Malstrom, C., and S. James.** 1998. Inhibition of murine splenic and mucosal lymphocyte function by enteric bacterial products. *Infection and immunity* **66**:3120-3127.
- Matsuzawa, T., A. Kuwae, and A. Abe.** 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli* type III effectors EspG and EspG2 alter epithelial paracellular permeability. *Infect immun* **73**:6283-6289.

- Maynard, C., S. Bekal, F. Sanschagrín, R.C. Levesque, R. Brousseau, L. Masson, S. Larivière, and J. Harel.** 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J Clin Microbiol* **42**:5444-5452.
- McDonald, P. P., A. Bald, and M. A. Cassatella.** 1997. Activation of the NF-kappaB pathway by inflammatory stimuli in human neutrophils. *Blood* **89**:3421-3433.
- Murata, A., T. Shimazu, T. Yamamoto, N. Taenaka, K. Nagayama, T. Honda, H. Sugimoto, M. Monden, N. Matsuura, and S. Okada.** 1998. Profiles of circulating inflammatory- and anti-inflammatory cytokines in patients with haemolytic uremic syndrome due to *E. coli* O157 infection. *Cytokine* **10**:544-548.
- Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**:142-201.
- Pelczar, M. J. J., and E. C. S. Chan.** 1982. *Éléments de microbiologie*. Les Éditions HRW, Montréal, 515 pages.
- Ramboarina, S., P. J. Fernandes, S. Daniell, S. Islam, P. Simpson, G. Frankel, F. Booy, M. S. Donnenberg, and S. Matthews.** 2005. Structure of the bundle-forming pilus from enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **280**:40252-40260.
- Ramirez, K., R. Huerta, E. Oswald, C. Garcia-Tovar, J. M. Hernandez, and F. Navarro-Garcia.** 2005. Role of EspA and intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. *Infect Immun* **73**:103-113.

- Raymond, C. R., and B. N. Wilkie.** 2005. Toll-like receptor, MHC II, B7 and cytokine expression by porcine monocytes and monocyte-derived dendritic cells in response to microbial pathogen-associated molecular patterns. *Vet Immunol immunopath* **107**:235-247.
- Ruchaud-Sparagano, M. H., M. Maresca, and B. Kenny.** 2007. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function. *Cell Microbiol* **9**:1909-1921.
- Savkovic, S. D., A. Koutsouris, and G. Hecht.** 1997. Activation of NF-kappaB in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol* **273**:C1160-1167.
- Savkovic, S. D., J. Villanueva, J. R. Turner, K. A. Matkowskyj, and G. Hecht.** 2005. Mouse model of enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **73**:1161-1170.
- Sawai J., K. Sagara, S. Kasai, H. Igarashi, A. Hashimoto, T. Kokugan, M. Shimizu, and H. Kojima.** 2000. Far-infrared irradiation-induced injuries to *Escherichia coli* at below the lethal temperature. *J Industrial Microbiol Biotech* **24**:19-24.
- Schierack, P., M. Nordhoff, M. Pollmann, K. D. Weyrauch, S. Amasheh, U. Lodemann, J. Jores, B. Tachu, S. Kleta, A. Blikslager, K. Tedin, and L. H. Wieler.** 2006. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for *in vitro* studies of microbial pathogenesis in swine. *Histochem Cell Biol* **125**:293-305.

- Sharma, R., S. Tesfay, F. L. Tomson, R. P. Kanteti, V. K. Viswanathan, and G. Hecht.** 2006. Balance of bacterial pro- and anti-inflammatory mediators dictates net effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**:G685-694.
- Sherman, P., R. Soni and M. Karmali.** 1988. Attaching and effacing adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium *in vivo*. *Infect Immun* **56**(4): 756-61.
- Solano-Aguilar, G. I., K. G. Vengroski, E. Beshah, and J. K. Lunney.** 2000. Isolation and purification of lymphocyte subsets from gut-associated lymphoid tissue in neonatal swine. *J Immunol Methods* **241**:185-199.
- Thacker, T. C., M. V. Palmer, and W. R. Waters.** 2007. Associations between cytokine gene expression and pathology in *Mycobacterium bovis* infected cattle. *Vet Immunol Immunopath* **119**:204-213.
- Thomas, N. A., W. Deng, J. L. Puente, E. A. Frey, C. K. Yip, N. C. Strynadka, and B. B. Finlay.** 2005. 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* **57**:1762-1779.
- Trabulsi, L. R., R. Keller, and T. A. Tardielli Gomes.** 2002. Typical and Atypical Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerging Infectious diseases* **8**:508-513
- Tzipori, S., F. Gunzer, M. S. Sonnenberg, L. de Montigny, J. B. Kaper, and A. Donohue-Rolfe.** 1995. The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological

complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **63**:3621-3627.

van Ginkel, F. W., H. H. Nguyen, and J. R. McGhee. 2000. Vaccines for mucosal immunity to combat emerging infectious diseases. *Emerg Infect Dis* **6**: 123-132.

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

Weather, P. R., B. Young, and J. W. Heath. 2001. *Histologie fonctionnelle*. De Boeck Université, Bruxelles, 424 pages.

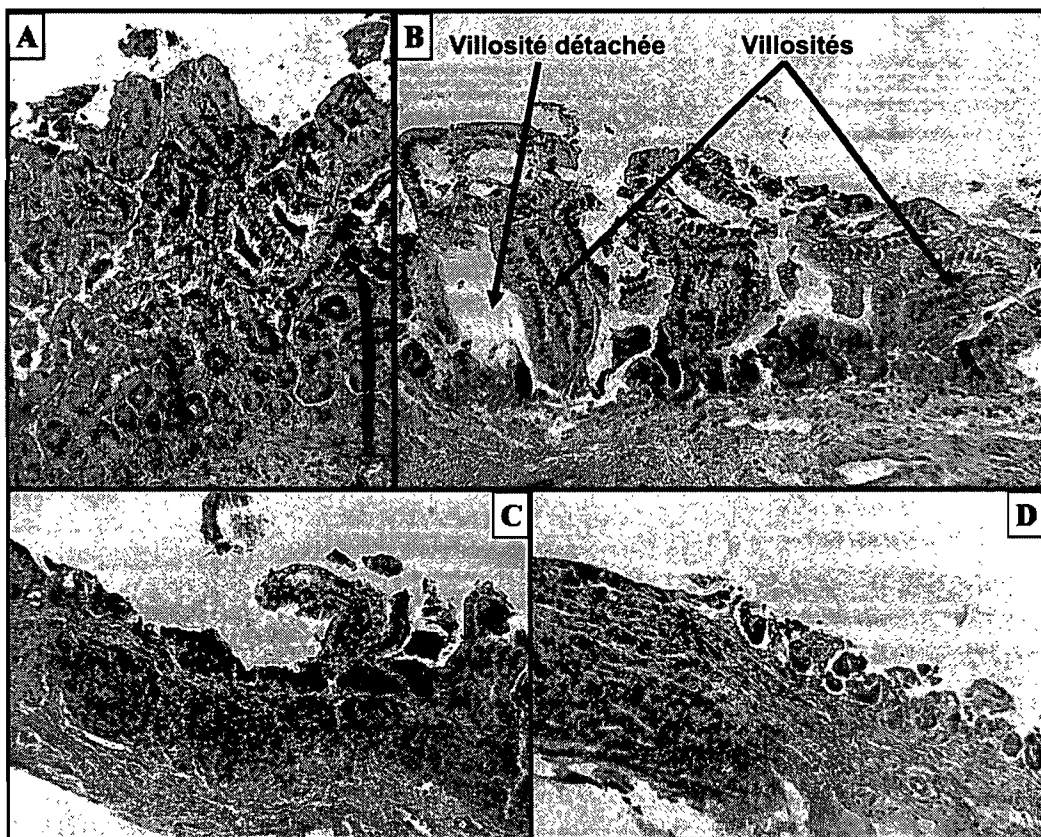
Westerholt, S., T. Hartung, M. Tollens, A. Gustrau, M. Oberhoffer, H. Karch, B. Klare, K. Pfeffer, P. Emmrich, and R. Oberhoffer. 2000. Inflammatory and immunological parameters in children with haemolytic uremic syndrome (HUS) and gastroenteritis-pathophysiological and diagnostic clues. *Cytokine* **12**:822-827.

Williams, P. P. 1993. Immunomodulating effects of intestinal absorbed maternal colostral leukocytes by neonatal pigs. *Can J Vet Res* **57**:1-8.

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

Annexes

Données complémentaires



Annexe Figure 1. Exemples des différents niveaux de dégradation tel qu'observé dans les coupes histologiques des explants colorées au HPS. A) plus de 90 % d'épithélium intact et moins de 10 % de villosités détachées, cote de niveau 0, B) entre 60 et 75 % d'épithélium intact et entre 25 et 40 % de villosités détachées, cote de niveau 2, C) entre 30 et 45 % d'épithélium intact et entre 55 et 70 % de villosités détachées, cote de niveau 4 et D) moins de 15 % d'épithélium intact et plus de 85 % de villosités détachées, cote de niveau 6.

Cote	Épithélium intact (%)	Villosités détachées (%)
0	+ de 90	0 à 10
1	75 à 90	10 à 25
2	60 à 75	25 à 40
3	45 à 60	40 à 55
4	30 à 45	55 à 70
5	15 à 30	70 à 85
6	- de 15	+ de 85

Annexe Tableau I. Échelle de dégradation des explants basée sur la quantité relative de villosités et/ou d'épithélium détaché par explant mise en place pour évaluer de façon semi-quantitative la dégradation des tissus. L'échelle est composée de sept niveaux de dégradation selon une appréciation visuelle de coupes histologiques des explants colorées au HPS.

ACCORD ET PERMISSION DES COAUTEURS D'UN ARTICLE

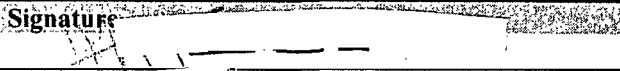

IDENTIFICATION DE L'ÉTUDIANT

Nom de l'étudiant Maurice Junior Dubois		Code permanent [REDACTED]
Sigle du programme M.Sc.	Titre du programme Sciences vétérinaires	Option Microbiologie

DESCRIPTION DE L'ARTICLE

Auteurs Maurice Junior Dubois, John M. Fairbrother et Éric Nadeau	
Titre Kinetics of the host cytokine response to attaching and effacing <i>Escherichia coli</i> (AEEC) infection in newborn pig ileal <i>In Vitro</i> Organ Culture (IVOC).	
Revue Infection and immunity	Date de publication Soumis

DÉCLARATION DES COAUTEURS

Déclaration <i>À titre de coauteurs de l'article identifié ci-dessus, nous autorisons le microfilmage du mémoire et nous sommes d'accord que Maurice Junior Dubois inclut cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre Cinétique de la réponse cytokinaire lors d'infections aux Escherichia coli causant des lésions de type attachant et effaçant dans un modèle de culture d'iléon (IVOC) d'origine porcine.</i>		
Coauteur John M. Fairbrother	Signature 	Date 21/4/8
Coauteur Éric Nadeau	Signature 	Date 2008.04.22
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date
Coauteur	Signature	Date