

Université de Montréal

LES BACTÉRIES EXPRIMANT AIDA-I INTERAGISSENT AVEC
L'APOLIPOPROTÉINE A-I CELLULAIRE

par

JASON LÉTOURNEAU

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

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

Août 2012

©Jason Létourneau, 2012

RÉSUMÉ

AIDA-I (adhesin involved in diffuse adherence) est une importante adhésine autotransporteur exprimée par certaines souches de *Escherichia coli* impliquée dans la colonisation des porcelets sevrés causant la diarrhée post-sevrage et la maladie de l'œdème. Une précédente étude de notre laboratoire a identifié l'apolipoprotéine AI (ApoAI) du sérum porcin, la protéine structurale des lipoprotéines à haute densité, comme récepteur cellulaire putatif de AIDA-I. L'interaction entre ces deux protéines doit être caractérisée. Ici, nous montrons par ELISA que AIDA-I purifiée est capable d'interagir avec l'ApoAI humaine, mais également avec les apolipoprotéines B et E2. L'ApoAI est rencontrée sous deux formes, soit libre ou associée aux lipides. Nous montrons que la forme libre n'interagit pas avec les bactéries AIDA-I+ mais s'associe spécifiquement à l'ApoAI membranaire de cellules épithéliales HEp-2. Afin d'étudier le rôle de l'ApoAI dans l'adhésion des bactéries, nous avons infecté des cellules HEp-2 en présence d'anticorps dirigés contre l'ApoAI, mais l'adhésion des bactéries AIDA-I+ n'a jamais été réduite. De plus, l'induction de l'expression de l'ApoAI par fénofibrate et GW7647 chez les cellules Caco-2 polarisée et Hep G2, n'a pas permis l'augmentation de l'adhésion cellulaire des *E. coli* exprimant AIDA-I. Notre étude suggère davantage que l'interaction entre AIDA-I et ApoAI n'intervient pas dans les mécanismes d'adhésion cellulaire.

Mots clés : Autotransporteur, AIDA-I, *Escherichia coli*, adhésion bactérienne, apolipoprotéine AI, lipoprotéine, transport inverse du cholestérol

ABSTRACT

The adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I) is an important autotransporter adhesin expressed by some strains of *Escherichia coli* and is involved in the intestinal colonisation of weaned piglets, causing the postweaning diarrhea and the edema disease. A previous study from our laboratory identified the apolipoprotein AI (ApoAI) from porcine serum, the structural protein of high density lipoproteins, as a putative receptor of AIDA-I. The interaction between these two proteins must be characterized. Here, we show that purified AIDA-I, using an ELISA assay, is able to bind the human ApoAI and the apolipoprotein B and E2. The ApoAI is found under two forms, either free or bound to lipid. We show that the free form of ApoAI does not interact with AIDA-I+ bacteria but specifically interact with membrane bound ApoAI on Hep-2 epithelial cells. To study the role of ApoAI in the adhesion of bacteria, we infected Hep-2 cells preincubated with antibodies to ApoAI. The adhesion of AIDA-I+ bacteria to the cells couldn't be reduced. Additionally, the induction of ApoAI synthesis using fenofibrate and GW7647 on polarized Caco-2 or Hep G2 cells did not increase the adhesion of AIDA-I+ bacteria. Our study suggests that the interaction between AIDA-I and ApoAI is not involved in the cellular adhesion of the bacteria.

Key words : Autotransporter, AIDA-I, *Escherichia coli*, bacterial adhesion, apolipoprotein AI, lipoprotein, reverse cholesterol transport

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux	v
Liste des figures	vi
Liste des sigles et abréviations	vii
Dédicace	ix
Remerciements	x
<u>REVUE DE LITTÉRATURE</u>	1
1.0 Mot sur la pathogénèse bactérienne	2
2.0 <i>Escherichia coli</i>	3
2.1 <i>E. coli</i> entéropathogéniques	3
2.2 <i>E. coli</i> entérohémorragiques	4
2.3 <i>E. coli</i> toxigéniques	5
2.4 <i>E. coli</i> entéroagrégatifs	6
2.5 <i>E. coli</i> entéroinvasifs	6
2.6 <i>E. coli</i> à adhérence diffuse	7
3.0 Diarrhée post-sevrage et maladie de l'œdème	8
3.1 Conséquences du sevrage	8
3.2 Diarrhée post-sevrage	10
3.3 Maladie de l'œdème	10
3.4 Les <i>E. coli</i> chez la diarrhée post-sevrage et la maladie de l'œdème	11
3.4.1 Les adhésines de la ED-PWD	11
3.4.1.1 Prévalence de AIDA-I chez les porcs	11
3.4.2 Les toxines associées à la ED-PWD	13
3.4.3 Rôle d'AIDA-I dans la ED-PWD	14
3.5 Préventions de la diarrhée post-sevrage et de la maladie de l'œdème	14
4.0 AIDA-I	15
4.1 Sécrétion des autotransporteurs	15
4.2 Caractérisation de AIDA-I	17

4.3 Les récepteurs cellulaires putatifs	18
4.3.1 Les récepteurs candidats publiés	18
4.3.2 Un nouveau récepteur identifié?	19
5.0 Les apolipoprotéines et lipoprotéines	20
5.1 Représentation des apolipoprotéines chez les organismes vivants	21
5.2 L'apolipoprotéine AI dans les HDL	22
5.2.1 Les HDL	23
5.2.1.1 Le transport inverse du cholestérol	24
5.2.1.1.1 Biogénèse des HDL naissants	25
5.2.1.1.2 Maturation des HDL	27
5.2.1.1.3 Excrétion du cholestérol dans la bile : reprise dans les hépatocytes	30
5.2.2 Structure et conformations de l'ApoAI	31
5.2.2.1 ApoAI libre	32
5.2.2.2 ApoAI liée aux HDL	32
5.3 Les autres lipoprotéines majeures	33
5.3.1 Les lipoprotéines à faible densité (VLDL et LDL)	34
5.3.2 Les chylomicrons	34
6.0 Étude de l'interaction AIDA-I – ApoAI	35
<u>MÉTHODOLOGIE</u>	37
<u>RÉSULTATS</u>	44
<u>DISCUSSION</u>	60
<u>CONCLUSION</u>	75
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	78

LISTE DES TABLEAUX

REVUE DE LITTÉRATURE

TABLEAU I : RECENSEMENT DES ÉTUDES DE LA PRÉVALENCE DE L'ADHÉSINE AIDA-I À TRAVERS LE MONDE.

LISTE DES FIGURES

REVUE DE LITTÉRATURE

- Figure 1 : Pathotypes classiques de *E. coli* causant des diarrhées**
- Figure 2 : Structure des systèmes de sécrétion type V.**
- Figure 3 : Représentation schématique du transport inverse du cholestérol.**
- Figure 4 : Biogénèse et maturation des HDL.**
- Figure 5 : Transfert du cholestérol des membranes cellulaires vers les HDL.**
- Figure 6 : Modélisation des trois conformations associées à l'ApoAI selon les degrés de lipidation.**

RÉSULTATS ET DISCUSSION

- Figure 1 : L'apolipoprotéine A-I purifiée interagit avec AIDA-I purifiée.**
- Figure 2 : AIDA-I purifiée interagit avec le sérum de différentes espèces.**
- Figure 3 : AIDA-I interagit avec les apolipoprotéines humaines purifiées.**
- Figure 4 : L'interaction entre AIDA-I purifiée et les composantes testées est spécifique et n'est pas retrouvée avec TibA.**
- Figure 5 : L'apolipoprotéine A-I dans sa forme libre n'interagit pas avec les bactéries exprimant AIDA-I.**
- Figure 6 : L'apolipoprotéine A-I cellulaire se lie avec les bactéries exprimant AIDA-I dans les cellules épithéliales cultivées.**
- Figure 7 : Compétition par anticorps contre l'ApoAI de l'adhésion cellulaire des bactéries exprimant AIDA-I.**
- Figure 8 : Effets d'activateurs de la synthèse d'ApoAI sur l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I chez les cellules sécrétrices d'ApoAI en culture.**
- Figure 9 : Modèle d'infection des entérocytes provoquant la ED et PWD chez les porcelets infectés avec des bactéries exprimant AIDA-I.**

LISTES DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

AAF	Aggregative adherence fimbriae
ABCA1	ATP-binding cassette transporter A1
ABCG1	ATP-binding cassette transporter G1
AIDA-I	Adhesin involves in diffuse adherence
APEC	Avian pathogenic <i>E. coli</i>
ApoAI	Apolipoprotein A-I
ApoB	Apolipoprotein B
ApoC	Apolipoprotein C
ApoE	Apolipoprotein E
Bfp	Bundle-forming pili
CE	Cholestérol esterifié
CETP	Cholesteryl ester transfer protein
CFA	Colonization factor antigen
CM	Chylomicron
CS	Coli surface antigen
DAEC	<i>E. coli</i> à adhérence diffuse
DAF	Decay accelerating factor
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EAEC	<i>E. coli</i> entéroagrégatif
ED	Maladie de l'œdème
EHEC	<i>E. coli</i> entérohémorragique
EIEC	<i>E. coli</i> entéroinvasif
EL	Lipase endothéliale
EPEC	<i>E. coli</i> entéro-pathogénique
ETEC	<i>E. coli</i> entérotoxigénique
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinaux
FC	Cholestérol libre
FCT	Forward cholesterol transport
HDL	High density lipoprotein
HL	Lipase hépatique
LCAT	Lecithin-cholesterol acyltransferase
LDL	Low density lipoprotein
LDLR	Low density lipoprotein receptor
LEE	Locus of enterocyte effacement
Lpf	Long polar fimbriae
LT	Heat-labile enterotoxin
PCF	Putative colonization factor
PL	Phospholipide
PLTP	Phospholipid transfer protein
PWD	Diarrhée post-sevrage
rHDL	HDL reconstitué
RCT	Reverse cholesterol transport

ROS	Reactive oxygen species
SAAT	Self associating autotransporteur
SOF	Serum opacity factor
SR-B1	Scavenger receptor class B type 1
SST3	Système de sécrétion type III
SST5	Système de sécrétion type V
STEC	Shiga-toxin producing <i>E. coli</i>
Stx	Shiga-like toxin
ST	Heat-stable enterotoxin
TG	Triglycéride
VLDL	Very low density lipoprotein

*À mes parents, qui m'ont permis de prendre goût à la science
et pour avoir épauler mes choix.*

REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont à mes parents Roberto Létourneau et France Paquet, pour m'avoir supporté dans tous mes choix et mes démarches durant mon parcours académique jusqu'à la Maîtrise. Les deux dernières années m'ont été plus difficiles au niveau personnel et leur support moral m'a été d'une aide précieuse. Je n'oublie pas aussi toute l'aide financière afin de payer mes études!

Un merci spécial à mon directeur de recherche, Michael Mourez, non seulement pour m'avoir donné la chance de travailler sur le sujet de ce mémoire durant ces deux dernières années, mais également pour m'avoir transmis son énergie et sa passion pour la science en général. On ne rencontre pas quelqu'un d'aussi stimulant que Michael tous les jours! Tu m'auras aussi permis de pousser mes activités à l'extérieur du laboratoire afin de me préparer dans mes plans futurs dans la pédagogie.

Les membres du laboratoire passés et présents, Jean-Philippe Côté, Marie-Ève Charbonneau et Dimitri Carrabin, Frédérick Berthiaume et Josée Labrie pour toute leur aide précieuse sur mon projet et pour avoir répondu à mes nombreuses questions depuis l'absence de Michael. Je n'oublierai pas votre patience pour toutes les gaffes et oublis non-intentionnelles que j'ai faits!

Finalement, je remercie le GREMIP sans quoi tout cela n'aurait pas été possible. À tous les bons moments que j'ai passés avec les étudiants, stagiaires et membres du centre de recherche!

REVUE DE LA LITTÉRATURE

1.0 Mot sur la pathogénèse bactérienne

La pathogénèse microbienne est un domaine très complexe en recherche. On peut la considérer comme étant l'étude de l'armement biologique et évolutionnaire entre un hôte et un pathogène spécifique. Les bactéries sont des organismes qui évoluent rapidement pour s'adapter à un environnement donné et a permis aux pathogènes de s'adapter à un hôte vivant afin de produire une infection efficace. Puisqu'il peut y avoir des échanges de matériel génétique intra ou interspèces via des bactériophages, transformation ou conjugaison bactérienne, les pathogènes modernes ont développé des relations très complexes avec leurs hôtes au niveau cellulaire et moléculaire.

Lors d'une infection bactérienne efficace, excluant les toxi-infections, l'étape primordiale de la pathogénèse bactérienne est la colonisation de l'hôte. Sans celle-ci, le pathogène ne peut pas rester en contact assez longtemps avec l'hôte spécifique pour pouvoir utiliser les nombreux facteurs de virulence dont la bactérie dispose pour y produire l'infection. Cette colonisation débute d'abord par un contact cellule-pathogène direct, effectuer par l'/les adhésine(s) exprimée(s) par le pathogène en question. Les adhésines reconnaîtront des protéines/sucres/lipides spécifiques à la surface de la cellule et peuvent être de toutes sortes, comme des fimbriae, de longues structures multiprotéiques filamenteuses ou simplement une protéine membranaire¹. C'est le contact spécifique entre l'adhésine et son récepteur qui permettra à la bactérie d'adhérer aux cellules de l'hôte. Ce contact peut être fait de façon directe avec le récepteur ou en se liant à une molécule soluble laquelle pouvant se lier à la cellule faisant ainsi le pont entre la bactérie et l'hôte (adhésion pont²). Lorsque le pathogène est adhérent à la cellule, il pourra produire une panoplie de facteurs d'adaptation, des facteurs toxiques et/ou facteurs permettant l'évasion du système immunitaire pour pouvoir survivre dans l'hôte, se répliquer et finalement, se disperser dans son environnement.

2.0 *Escherichia coli*

Escherichia coli, un bacille Gram - de la famille des *Enterobacteriaceae*, est une bactérie commensale retrouvée au niveau du système gastro-intestinal des hommes et autres mammifères. La flore microbienne contenant *E. coli* colonise le tractus intestinal des nouveau-nés quelques heures après l'accouchement³. Des souches pathogènes de *E. coli* existent aussi, et possèdent une diversité surprenante de plasmides qui peuvent se transférer entre les diverses souches, leur permettant de s'adapter à de nouvelles niches et de causer de nouvelles infections. Ces *E. coli* pathogènes causent une variété de maladies, dont des diarrhées, septicémies, infections urinaires et méningites⁴. En fait, les infections à *E. coli* sont des problèmes reconnus mondialement et causées en grande majorité par un manque de salubrité puisque les infections intestinales sont transmises par contact oro-fécal.

La classification des *E. coli* pathogéniques est complexe et repose sur la notion de pathotypes. Chaque pathotype possède un patron caractéristique de facteurs de virulence absent des souches non-pathogéniques. Par contre, on retrouve de plus en plus de souches «hybrides», c'est-à-dire qu'elles expriment des facteurs de virulence de différents pathotypes, montrant la complexité de cette classification. Une brève revue sera réalisée sur les divers pathotypes classiques, soit les entéropathogéniques (EPEC), entérohémorragiques (EHEC), entérotoxigéniques (ETEC), entéroagrégatifs (EAEC), à adhérence diffuse (DAEC), entéroinvasifs (EIEC)⁵. À noter qu'il existe également un pathotype extraintestinal (ExPEC) causant les infections urinaires et méningites, et un pathotype adapté aux volailles nommé APEC (avian pathogenic *E. coli*). Ce dernier cause des infections extraintestinales et est responsable d'infections respiratoires, de péricardites et de septicémies chez la volaille⁵.

2.1 *E. coli* entéropathogéniques

Les infections à EPEC sont des infections rares dans les pays industrialisés, mais restent encore une cause majeure de mortalité dûe aux diarrhées infantiles et adultes dans les pays en voie de développement. Ce pathotype provoque un changement histopathologique caractéristique au niveau des entérocytes affectés : les lésions d'attachement et effacement. Les entérocytes perdent localement leurs microvillosités et un remaniement du cytosquelette

eucaryote est induit au contact de l'EPEC, promouvant la formation d'un piédestal permettant une adhésion intime entre la bactérie et la cellule (figure 1a)⁵. Cette adhésion et nucléation des protéines du cytosquelette sont réalisées par l'injection de Tir dans la membrane de la cellule hôte par le système de sécrétion de type III (SST3), servant de récepteur pour l'intimine, située dans la membrane externe de la bactérie^{5,6}. Tir, et d'autres effecteurs du SST3, EspFGH, sont codés par l'ilôt de pathogénécité LEE (Locus of enterocyte effacement)⁶. Ces effecteurs permettront l'induction d'une puissante réponse inflammatoire et l'apoptose des entérocytes infectés. De plus, les EPEC forment des microcolonies à la surface des entérocytes via les Bfp (Bundle-forming pili), un pili de type IV⁷. Ce pili permet non seulement l'adhésion initiale aux cellules, mais également une agrégation des EPEC à leur surface, qui donnera une adhésion localisée⁷. La formation de microcolonies mène, au final, à l'apparition d'un biofilm caractéristique aux EPEC sur la surface intestinale⁸.

2.2 *E. coli* entérohémorragiques

Les EHEC sont responsables d'infections plus graves, dont des diarrhées fréquemment hémorragiques, nécroses intestinales, et le syndrome hémolytique urémique, qui mène à une insuffisance rénale pouvant être fatale. Les EHEC partagent beaucoup de facteurs d'adhésion avec les EPEC. Citons, entre-autres, Lpf (long polar fimbriae) et ToxB⁹. Tout comme les EPEC, les EHEC peuvent posséder le locus de gènes LEE et induisent des lésions d'attachement et effacement localement⁹. Le facteur de virulence clé des EHEC qui les différencie des EPEC sont les shigatoxines Stx 1 et 2 (Shiga-like toxin 1-2) (figure 1b). Les Stx sont des toxines de type AB et déstabilisent les ribosomes en clivant l'ARNr, stoppant la synthèse protéique¹⁰. Elles sont également des toxines particulières : elles peuvent traverser la barrière épithéliale et se retrouver dans la circulation sanguine, où elles auront une activité toxique directe sur les reins et les artères¹⁰. D'autres toxines et facteurs de virulence sont fréquemment retrouvés chez les EHEC, dont des uréases¹¹, hémolysines¹² et un facteur anticoagulant, EspP¹³. Il est intéressant de noter qu'une grande quantité de souches produisant Stx ne possède pas le locus LEE. Ces souches sont termées STEC (Shiga-toxin producing *E. coli*)⁵.

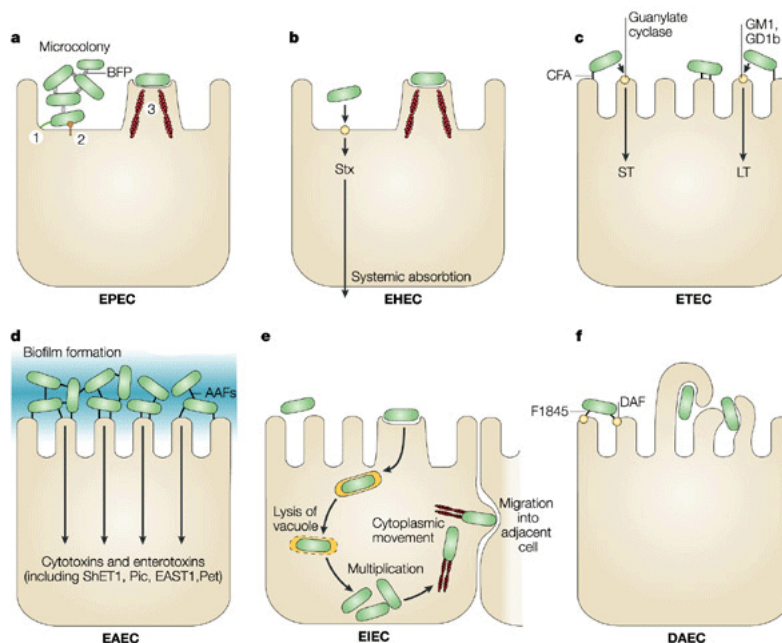


Figure 1 : Pathotypes classiques des *E. coli* causant des diarrhées. Les principaux facteurs de virulence caractéristiques des six pathotypes diarrhéogéniques sont montrés. Adapté de Kaper J.B. *et al*, 2004⁵.

2.3 *E. coli* entérotoxigéniques

Les ETEC sont des *E. coli* provoquant des diarrhées de gravité allant de bénigne à violente et sont la cause de la «diarrhée des voyageurs». Les *E. coli* classés dans ce pathotype peuvent exprimer une quantité étonnante et diversifiée de facteurs de colonisation dont plusieurs CFA (colonization factor antigen), CS (coli surface antigen) et PCF (putative colonization factor)⁵, d'origines fibrillaires (pili flexibles) ou fimbriaires (pili non flexibles) (figure 1c). Plus de 20 de ces antigènes spécifiques aux ETEC sont rapportés jusqu'à présent¹⁴. De plus, une multitude de fimbriae a été découverte chez des souches de ETEC animales, une très grande cause de diarrhées chez ces derniers. Notons, parmi tant d'autres, les fimbriae F4, F5 et F18 retrouvées chez les souches porcines et bovines, mais absentes des souches humaines¹⁵. Ces souches, humaines et animales, sont caractérisées par la sécrétion d'entérotoxines, soit thermolabiles (LT) et/ou thermostables (ST). LT est une ADP-ribosyl transférase qui activera les canaux chlorure chez les entérocytes affectés, provoquant une très grande perte d'eau¹⁶. ST, quant à elle, peut être retrouvée sous deux formes, soit STa ou STb. STa est retrouvée principalement chez les souches d'origines humaines tandis que STb est retrouvée chez les ETEC d'origine animale⁵. Les deux entérotoxines ST augmentent la sécrétion d'ions des

entérocytes affectés¹⁶. Les ETEC possèdent, véritablement, une spécificité animale selon la variété d'adhésines et d'entérotoxines exprimées.

2.4 *E. coli* entéroagrégatifs

La véritable nature des EAEC est controversée. En fait, les EAEC ne possèdent pas, strictement parlant, un pattern défini de facteurs de virulence. Ils sont caractérisés par l'absence de sécrétion des entérotoxines ST ou LT, et par leur adhésion «auto-agrégative» sur les cellules épithéliales *in vitro*⁵. Les bactéries adhèrent en «briques empilées», une structure conférée par les fimbriae AAF (aggregative adherence fimbriae) (figure 1d)¹⁷. La colonisation de l'hôte par les EAEC mène à une association faible avec la muqueuse intestinale par plusieurs couches de EAEC et une inflammation localisée qui endommagera la muqueuse^{18,19}. Plusieurs toxines peuvent être retrouvées chez les EAEC dont, ShET1, provoquant des diarrhées muqueuses, EAST1, homologue à STa provoquant diarrhées aqueuses, et Pet, une toxine cytotoxique remaniant le cytosquelette et détachant les entérocytes affectés⁵. Ces toxines ne sont pas nécessairement associées directement aux EAEC. Plusieurs souches ne sécrètent pas toutes ces toxines et le motif d'adhésion est aussi partagé avec des clones non pathogènes²⁰. D'autre part, EAST1 est également retrouvé chez des souches commensales²¹. Donc, la classification des EAEC n'est pas encore définitive et d'autres toxines, facteurs de colonisation ou de fitness inconnus communs à tout ce pathotype restent à être découverts. Finalement, Kaper et collaborateurs⁵ ont avancé une nouvelle manière pour classer les *E. coli* dans ce pathotype. Ils ont montré que la plupart des gènes codant pour des facteurs de virulence des EAEC sont contrôlés sous le régulon *aggR*, un gène codant un activateur transcriptionnel. Ce régulon, jusqu'à présent, est retrouvé chez la très grande majorité des EAEC dans les cas de diarrhées humaines, et absents chez les autres pathotypes et clones commensals²⁰. Somme toute, nous ne connaissons pas encore un ensemble de facteurs de virulence caractérisant entièrement le pathotype des EAEC.

2.5 *E. coli* entéroinvasifs

Fortement similaires à *Shigella flexneri*, les EIEC sont souvent confondus avec ce pathogène. Les EIEC provoquent des symptômes identiques à la shigellose, à savoir des diarrhées

sanglantes, muqueuses ou la dysenterie, par une pathogénèse similaire⁵. Ces *E. coli* n'expriment pas d'entérotoxines mais vont provoquer des dommages aux entérocytes par leur action mécanique lors de l'infection et une forte inflammation local au site infectieux²². Contrairement aux autres pathotypes de *E. coli*, les EIEC ont un cycle d'infection intracellulaire cytoplasmique qui les protège contre l'action du système immunitaire présent dans le tractus gastro-intestinal (figure 1e). Grâce à un SST3, les EIEC vont envahir l'épithélium intestinal²² via les protéines IpaABCD qui induisent un profond remaniement cytoskelettique au niveau des EIEC. Les protrusions créées englobent les bactéries et permettent leur pénétration dans la cellule, entourée d'une vacuole cytosolique²³. Cette vacuole sera rapidement lysée par l'action de IpaB et IpaC, relâchant les bactéries au cytoplasme⁵. Ces facteurs de virulence sont retrouvés au niveau du plasmide pWR100, présent chez tous les *Shigella* et les EIEC, mais absent de toutes les autres souches entériques ou non, comme montré par Venkatesan et collaborateurs²⁴. Au niveau du cytoplasme, la protéine IcsA confère aux EIEC une mobilité intracytoplasmique en forçant la nucléation de l'actine de l'hôte à un des pôles de la bactérie²⁵. À ce moment, les EIEC pourront se disperser, infecter les cellules épithéliales adjacentes et induire l'apoptose dans ces cellules²⁶. Il y aura, au final, destruction de l'épithélium intestinal au point infectieux.

2.6 *E. coli* à adhérence diffuse

Un autre pathotype, les DAEC, affecte principalement les enfants dans les pays en voie de développement. Ces *E. coli* sont classées selon leur patron d'adhésion distinct. Comme leur nom l'indique, les DAEC adhèrent d'une manière diffuse⁵ à la surface de cellules épithéliales comme les HEP-2. L'adhésion de ces DAEC à la surface de ces cellules provoquera une extension cellulaire qui englobera les bactéries, unique à ce pathotype (figure 1f). Ces effets cellulaires sont provoqués par les adhésines de la famille Afa/Dr, dont le membre le plus étudié est le fimbriae F1845²⁷. La famille des Dr se lie au récepteur DAF (Decay-accelerating factor), et provoquent l'extension cellulaire caractéristique²⁸. F1845 induit également, chez l'hôte infecté, une hyperproduction d'IL-8 qui exacerbe et perpétue la réponse inflammatoire²⁸. Il est à noter que l'autotransporteur afimbriaire AIDA-I (Adhesin Involved in

Diffuse Adherence) permet également une adhésion diffuse²⁹ mais ne permet pas l'apparition de ces protrusions cytoplasmiques. Cet autotransporteur est le sujet de ce de mémoire.

3.0 Diarrhée post-sevrage et maladie de l'œdème

La diarrhée post-sevrage (PWD) et la maladie de l'œdème (ED) des porcelets sont les infections bactériennes les plus fréquemment retrouvés dans les élevages porcins à travers le monde. Ces deux maladies, se déclarant lors d'une étape cruciale dans le développement des porcelets sur les fermes, le sevrage du lait maternel, affectent profondément le tractus gastro-intestinal des porcelets affectés. La ED et la PWD peuvent être d'origines virales ou bactériennes dont *E. coli*, l'agent étiologique bactérien chez les porcelets infectés. Lorsque ces porcelets sont colonisés par ces *E. coli* pathogènes, ces bactéries utilisent leurs diverses toxines pour produire les symptômes caractéristiques de la ED ou de la PWD. Les conséquences de ces deux maladies sont importantes au niveau des élevages de porcs à travers le monde. Il n'est alors pas surprenant de constater des importants dégâts économiques mondiaux engendrés par ces deux affections dans l'industrie porcine mondiale.

3.1 Conséquences du sevrage

Les causes permettant l'apparition de la ED et de la PWD sont nombreuses, et semblent toutes potentialiser la prolifération des *E. coli* qui y sont associées. Lorsque les porcelets naissent, ils sont rapidement nourris au lait de la truie. Le lait maternel contient une très forte quantité d'anticorps, principalement les IgA, IgG et IgM³⁰, qui promeuvent une immunisation passive efficace des nouveau-nés face aux pathogènes présents dans l'environnement des porcelets. Ceci peut expliquer en partie pourquoi les porcelets non sevrés sont beaucoup moins aptes à développer les infections retrouvés chez les porcelets sevrés. Il a été démontré que des anticorps maternels reconnaissant les sérotypes de *E. coli* O8 et O141 peuvent être transmis aux porcelets nourris au colostrum et au lait maternel³⁰. Il est alors possible que les anticorps maternels protègent contre les agents étiologiques de la ED et PWD avant sevrage.

Lors du sevrage, l'alimentation des porcelets transite d'une diète au lait vers une diète solide. Une augmentation de l'apparition des cas de ED et de PWD a été démontrée lorsque les

porcelets avaient un moins bon apport nutritionnel, dans le cas présent, une quantité moindre de la diète solide ingérée lors de la première semaine de sevrage³¹. D'autre part, une quantité élevée de nourriture ingérée provoque également la PWD et mène à une excrétion accrue de *E. coli* dans les fèces qui peut durer jusqu'à deux fois plus longtemps chez les porcelets affectés³². De plus, les facteurs environnementaux, comme une température ambiante instable, une hygiène à la ferme médiocre et un manque de soins apportés aux porcelets sont également associés avec une augmentation des deux maladies^{32,33}. Tous ces facteurs mènent à une profonde modification de la paroi intestinale, dont une diminution de la capacité d'absorption du petit intestin par des entérocytes immatures³⁴, et des fonctions intestinales causant une forte diminution de la capacité enzymatique digestive^{35,36} chez les porcelets sevrés. Il n'est alors pas surprenant d'observer également une modification de la flore intestinale des porcelets aux premières semaines du sevrage. En effet, les nouveau-nés possèdent une flore intestinale beaucoup plus diversifiée que les porcelets sevrés³⁷. Cette perte de diversité pourrait, entre autres, réduire drastiquement la résistance à la colonisation intestinale des *E. coli* pathogènes causant la ED et la PWD.

Il faut noter que la simple présence des *E. coli* pathogènes au niveau du tractus gastro-intestinal ne permet pas expliquer entièrement l'apparition des signes cliniques de la ED et la PWD chez les porcelets sevrés. Plusieurs infections expérimentales avec diverses souches de *E. coli* cliniques associées à ces maladies ont été inefficaces pour les reproduire malgré une colonisation réussie des intestins des porcelets^{32,37,38}. Le modèle d'infection accepté en ce moment est le suivant : une diminution de l'efficacité de la fonction immunitaire porcine³⁹⁻⁴¹ est provoquée par les différents facteurs énumérés, ce qui donnerait l'opportunité aux souches de *E. coli* associées à la ED et la PWD de pouvoir utiliser leurs diverses adhésines et toxines afin de coloniser l'hôte et d'engendrer une infection efficace. En lien avec une diminution de l'immunité, les cellules de rate de porcelets sevrés produisent beaucoup moins d'IL-2, un puissant activateur de la fonction immunitaire, que les contrôles non sevrés en présence d'un activateur non spécifique^{37,41}. Somme toute, deux événements doivent se produire en période de sevrage pour provoquer ces infections à *E. coli* : un stress physiologique provoquant une atténuation du système immunitaire des porcelets sevrés et la présence des souches pathogènes de *E. coli* dans l'environnement immédiat des porcelets.

En conclusion, la ED et la PWD sont des maladies opportunistes. La virulence des souches concernées est modérée, comme vue par les études tentant de reproduire ces maladies chez des porcelets. Ceci rend donc les études sur la ED et PWD causées par *E. coli* difficiles et plaide pour des stratégies de décolonisation sélective de ces souches dans le tractus intestinal de l'hôte.

3.2 Diarrhée post-sevrage

La PWD est une maladie qui apparaît très tôt au sevrage, généralement durant les premiers jours, et jusqu'à deux semaines post-sevrage⁴². Les conséquences de la PWD sont de toutes sortes : diarrhée, perte d'appétit, diminution de gain de poids, œdèmes intestinaux, déshydratation, voir même la mort chez les porcelets les plus affectés⁴². Cette infection est causée par des ETEC qui prolifèrent et colonisent les porcelets affectés⁴². Plus particulièrement, les ETEC impliqués possèdent un large éventail d'adhésines qui leur permettent de coloniser l'iléum et le jéjunum des porcelets. En fait, la pathogénèse des ETEC dans la PWD n'est pas encore bien détaillée due à la large gamme de facteurs de virulence impliqués.

3.3 Maladie de l'œdème

La ED, tout comme la PWD, est également une maladie dont les rôles des facteurs de virulence impliqués ne sont pas encore bien compris, mais est causée par des STEC. Les symptômes chez les porcelets sevrés apparaissent également après une à deux semaines post-sevrage⁴³. Lorsque les premiers symptômes apparaissent, le porcelet est déjà dans un stade avancé de la maladie⁴⁴. Aucun traitement contre la ED n'existe dû à la gravité des dommages physiologiques et de la vitesse d'apparition des symptômes. En fait, les STEC responsables de cette maladie occasionnent un très haut taux de mortalité car les *E. coli* causent l'apparition d'œdèmes sur différents organes, des troubles neurologiques et de l'ataxie qui causeront au final, une mort rapide des porcelets infectés⁴⁴.

3.4 Les *E. coli* chez la diarrhée post-sevrage et la maladie de l'œdème

Plusieurs études continuent à se consacrer à l'étude de la de la pathogénie et des facteurs de virulence responsables de la ED et PWD. À ce jour, plusieurs facteurs de virulence ont été découverts, et le consensus est qu'une large gamme d'adhésines et toxines provoque l'apparition des maladies complexes que sont la ED et la PWD.

3.4.1 Les adhésines de la ED-PWD

Pour produire la ED ou PWD, les *E. coli* doivent d'abord adhérer aux entérocytes et résister à la force mécanique du tractus gastro-intestinal, et cette étape est médiée par les adhésines. D'abord, la colonisation des intestins des porcelets infectés est effectuée via le fimbriae F18, l'adhésine la plus fréquemment retrouvée chez les souches de ED et de PWD^{43,45}. Le récepteur de cette adhésine n'est pas encore connu, mais semble être liée à l'expression dominante de la fucosyltransférase codée par le gène *fut1*⁴⁶. Or, *fut1* n'est pas exprimée chez tous les porcelets et certains porcelets *fut1*- développent quand même la ED ou PWD, indiquant que d'autres adhésines participent à la colonisation des intestins affectés. En fait, quelques-unes de ces adhésines ont déjà été identifiées comme étant les fimbriae F4, F5, F6 et F18⁴⁷⁻⁵⁰. De plus, une adhésine afimbriaire est couramment détectée dans les souches de *E. coli* de ED et PWD chez les porcs infectés et non chez les porcs sains : AIDA-I, sujet de ce mémoire. L'importance de AIDA-I ainsi que de sa présence chez les souches de ED et PWD seront abordées.

3.4.1.1 Prévalence de AIDA-I chez les porcs

Les souches de *E. coli* exprimant AIDA-I dans les cas de ED-PWD sont retrouvées partout à travers le monde chez diverses fermes. Plusieurs études ont tenté d'en comprendre l'incidence et la propagation des souches cliniques de *E. coli* exprimant AIDA-I. Au Vietnam, une étude a démontré que 40 de 69 souches causant soit la ED ou la PWD comportaient le gène d'AIDA-I et en Corée, 2,3% de 1002 isolats de 1114 fermes d'élevage de porcs le possédaient⁵¹. À l'aide d'un PCR multiplex, *aidA* a été détectée dans 6,5% des souches de ED-PWD isolées en Chine⁵². AIDA-I est également retrouvé dans les pays occidentaux ne faisant pas l'élevage intensif de porcs. L'étude conduite par Ngeleka *et al* en 2003 a démontré que presque 10% des

souches isolées au Canada étaient positives pour ce gène⁵⁰. Quant aux États-Unis, 26,9% de 175 isolats exprimant des fimbriae possédaient également AIDA-I⁴⁸ et jusqu'à 20,6% en Allemagne⁵³. Une étude plus récente réalisée par Zajacova et collaborateurs (2011) a identifié le gène *aidA* dans 5,05% de 277 souches isolées de porcelets souffrant de diarrhées entre 2005 et 2009 en République tchèque⁵⁴ et 63% en Belgique⁵⁵. La fréquence d'isolation d'AIDA-I dans ces souches pathogènes est résumée dans le tableau I.

Il est intéressant de noter que cette fréquence est beaucoup moins élevée chez les cas humains. En fait, en France, lors d'une petite éclosion de cas de diarrhées sporadiques infantiles, seulement 3,9% des 335 souches possédaient *aidA*⁵⁶. Malgré qu'AIDA-I ne soit pas aussi recherchée, il serait possible que cette adhésine ne soit pas aussi importante sur la colonisation intestinale des hommes que sur les porcelets. Par exemple, la ED et la PWD se produisent lorsque les porcs sont sevrés et lorsque l'efficacité de leur système immunitaire est fortement atteinte, conditions qui sont fréquemment retrouvées dans l'élevage porcin. Il semble que la colonisation des *E. coli* par AIDA-I soit retrouvée que dans un état particulier de l'hôte infecté, que ce soit durant le sevrage des porcs ou lorsque les enfants sont de jeunes âges.

La prévalence modérée d'AIDA-I dans les souches de *E. coli* à ED et PWD indique qu'elle ne provoque pas, à elle seule, l'apparition de ces maladies. De ce fait, on retrouve très souvent AIDA-I dans des souches exprimant également l'adhésine F18. Une étude réalisée par Mainil et collaborateurs a même démontré qu'AIDA-I est codée sur le plasmide codant également F18⁵⁵. De ces observations, AIDA-I est un facteur de virulence accessoire important dans la ED et PWD.

TABLEAU I : RECENSEMENT DES ÉTUDES DE LA PRÉVALENCE DE L'ADHÉSINE AIDA-I À TRAVERS LE MONDE.

Étude	Origine des souches	Pays	Nombre d'isolats AIDA-I	% des isolats AIDA-I
Zajacova <i>et al</i> , 2011 ⁵⁴	PWD	République tchèque	14/277	5,05
Oanh <i>et al</i> , 2010 ⁵⁷	ED	Vietnam	40/69	58
Zhao <i>et al</i> , 2008 ⁵²	ED et PWD	Chine	21/324	6,5
Zhang <i>et al</i> , 2007 ⁴⁸	PWD	États-Unis	72/304	26,9
Ha <i>et al</i> , 2004 ⁵¹	PWD	Corée	23/1002	2,3
Ngeleka <i>et al</i> , 2003 ⁵⁰	PWD	Canada	15/170	8,8
Mainil <i>et al</i> , 2002 ⁵⁵	ED	Belgique	111/174	63
Niewerth <i>et al</i> , 2001 ⁵³	ED et PWD	Allemagne	27/104	20,6

3.4.2 Les toxines associées à la ED-PWD

Pour produire un effet cytotoxique sur les entérocytes colonisés, les souches de *E. coli* associées sécrètent des toxines qui permettront de produire les effets caractéristiques de la PWD ou de la ED. Pour la PWD, un large éventail de toxines est détecté, dont STa, STb, LT et EAST1^{47,49}. Ces toxines permettront la perte d'électrolyte au niveau du lumen intestinal chez les entérocytes affectés, et, au final, une perte d'eau provoquant la diarrhée caractéristique.

Concernant la ED, les dommages physiologiques sont produits par la toxine Stx2e. En fait, cette toxine est sécrétée dans le lumen intestinal par les *E. coli* colonisés et se lie aux entérocytes via les récepteurs Gb₃ et Gb₄ exprimés par les entérocytes⁵⁸. Ensuite, cette toxine traverse la barrière intestinale et se retrouve au niveau de la circulation sanguine, où elle pourra se propager et affecter les divers organes⁴³. Il est intéressant de noter que Stx2e peut également se lier à une portion d'érythrocytes porcins, ce qui pourrait augmenter le pouvoir de

dissémination de la toxine chez les porcelets infectés⁵⁸. Les signes neurologiques et/ou l'apparition d'œdème suivront.

3.4.3 Rôle de AIDA-I dans la ED-PWD

En plus d'être une adhésine à prévalence modérée dans les souches de *E. coli* diarrhéiques de porcs, il a été montré que AIDA-I possède un rôle central dans l'apparition de la ED et PWD dans certains pathotypes. Ravi *et al* (2007) ont infecté des porcelets nouveau-nés privés de colostrum avec la souche PD20 (AIDA-I⁺/Stb⁺), une ETEC causant la PWD⁵⁹. Les huit porcelets infectés ont développé une diarrhée 16h postinfection. Notre laboratoire a produit le mutant PD20M, n'exprimant plus AIDA-I. Lorsque les porcelets ont été infectés avec cette souche, aucune diarrhée n'a été observée. En immunohistochimie, les colons d'animaux infectés avec PD20 ont montré une très forte charge bactérienne AIDA-I positive, à l'instar de PD20M où la charge bactérienne était quasi absente. Il est intéressant de noter qu'une étude a détecté, par PCR quantitatif, une forte activité transcriptionnelle du gène *aidA* en infectant une anse de porc avec une EHEC *aidA*⁺ impliquée dans la ED⁵⁹. Finalement, les souches AIDA-I⁺ sont souvent associées avec Stx2e et STb chez les porcelets diagnostiqués avec la ED ou PWD^{50,53,60}. Ces observations montrent qu'AIDA-I est une adhésine importante associée aux facteurs de virulence majeurs de la ED et PWD, incluant l'adhésine F18, et est impliquée dans la colonisation intestinale de l'hôte.

3.5 Préventions de la diarrhée post-sevrage et de la maladie de l'œdème

Le traitement le plus fréquemment utilisé pour prévenir la ED et PWD est l'utilisation préventive d'antibiotiques. On constate alors l'énorme problème qu'occasionne cette utilisation : la plupart des souches de *E. coli* causant la ED et PWD possèdent un patron de résistance à divers antibiotiques, dont ceux ajoutés à la diète porcine pour prévenir ces maladies⁴². Une étude a montré que la très grande majorité de 286 souches isolées de ETEC et de STEC chez les cas de ED et PWD étaient résistantes aux 15 antibiotiques les plus fréquemment utilisés dans l'industrie porcine⁶¹. Au Vietnam, 84% des 69 souches isolées de cas de ED étaient multirésistantes, à au moins cinq antibiotiques utilisés⁵⁷. L'Europe a, par ce type de problème, banni l'utilisation d'antibiotiques comme promoteur de croissance⁶².

D'autres stratégies de traitements sont développées pour prévenir la ED et PWD. Par exemple, l'addition de zinc et de cuivre⁶³ à la diète, de colicine E1⁶⁴, vaccination contre Stx⁴⁴ et d'une thérapie phagique⁶⁵ ont montré une diminution de la fréquence de la ED et PWD. Malgré tout, l'efficacité de ces traitements n'est pas assez élevée pour justifier le coût additionnel qu'ils imposeraient et les effets de certains de ces composés sur la santé humaine ne sont pas connus. Il est alors important d'avoir plus de détails concernant les mécanismes pathogéniques exacts des ETEC et des STEC entrant en jeu dans la ED et PWD afin de trouver des traitements alternatifs pour prévenir ces maladies, à faible coût économique, sans occasionner de nouvelles résistances et de problèmes sur la santé humaine.

4.0 AIDA-I

Le groupe de Schmidt, en 1989, a été le premier à isoler AIDA-I²⁹. À partir d'une souche de EPEC, 2787, isolée d'un enfant atteint de diarrhée, ils ont isolé des gènes conférant l'adhérence diffuse *in vitro* observée chez cette souche de *E. coli*. Par clonage d'ADN sauvage partiellement digéré dans une *E. coli* K-12, ils ont démontré que l'adhésion diffuse aux cellules HEp-2 et HeLa était causée par une protéine afimbriaire de 100 kDa nommée AIDA-I. Plus tard, cette protéine a été caractérisée comme étant un autotransporteur, un exemple de système de sécrétion type V (SST5)⁶⁶.

4.1 Sécrétion des autotransporteurs

Les SST5 sont exclusivement retrouvés chez les bactéries Gram négatives. On estime que les autotransporteurs sont sécrétés chez toutes ces bactéries. Ils médient la biogénèse d'une large superfamille de protéines qui sont d'importants facteurs de virulence et possédant des rôles de toute sortes. Les autotransporteurs peuvent être, entre-autres, des adhésines (pertactine, *Bordetella pertussis*), invasines (NadA *Neisseria meningitidis*), protéases (sérine protéases, *Enterobacteriaceae*), lipases (EstA *Pseudomonas aeruginosa*), facteurs de résistance au sérum (UspA1, *Moraxella catarrhalis*), promouvoir la formation de biofilm (Cah, *E. coli*) ou l'autoagrégation (YadA, *Yersinia enterocolitica*)⁶⁷⁻⁶⁹.

Ce système de sécrétion est le plus simple connu, sans toutefois lui enlever sa complexité. Il consiste du passage de la membrane interne vers le périplasme, et de l'excrétion de l'autotransporteur par la formation d'un pore dans la membrane externe. Premièrement, le passage de la membrane interne est effectué par le complexe Sec⁷⁰. En fait, l'extrémité N-terminale des autotransporteurs code une séquence signale Sec plus longue que la séquence typique de ~18 acides aminés^{70,71}. L'importance de l'extension de séquence signale n'est pas encore tout à fait claire, mais pourrait avoir un rôle dans le bon repliement ou l'assemblage des autotransporteurs⁷². La deuxième étape consiste à l'autotransport de la partie fonctionnelle de l'autotransporteur, le domaine passager, vers la surface bactérienne. Cette translocation est produite par la formation d'un tonneau- β C-terminal (domaine translocateur) dans la membrane externe qui permettra la sécrétion du domaine passager⁷³ et son repliement pour former un hélice- β . Ces étapes représentent un autotransporteur classique (Va, figure 2). Il existe également une sécrétion d'autotransporteur à deux partenaires (Vb, figure 2), où une protéine forme le pore nécessaire au transport de la protéine passager. Le type Vc représente les autotransporteurs trimériques, où l'autotransporteur est composé d'un hmotrimère, chaque monomère composant 4 des 12 brins du tonneau β (Vc, figure 2)⁷³⁻⁷⁵. Récemment, un autre SST5 a été identifié comme étant la sécrétion d'un autotransporteur classique inversé. La sécrétion des autotransporteurs se fait habituellement du côté C-terminal vers N-terminal. Par contre, chez l'intimine de *E. coli*, la sécrétion est réalisée dans le sens inverse avec une structure très similaire à celle d'un autotransporteur⁷³.

Il est intéressant de noter que l'insertion du domaine translocateur dans la membrane externe a toujours été perçue comme une capacité intrinsèque de ce domaine. Or, une étude récente a montré que cette insertion est catalysée par le complexe Bam, un système d'insertion générale de domaines tonneau β dans la membrane externe. Lorsque BamA (YaeT) chez *E. coli* est inactivé, on retrouve une diminution d'expression de AIDA-I à la surface bactérienne⁷⁶. Également, les autotransporteurs, lors du transport au périplasme, s'associent avec des chaperones, dont SurA, Skp, FkpA et DegP afin d'éviter les repliements prématurés⁷³. Ces dernières observations remettent en question le terme «auto»transporteur doit être employé pour caractériser les protéines sécrétées par le SST5.

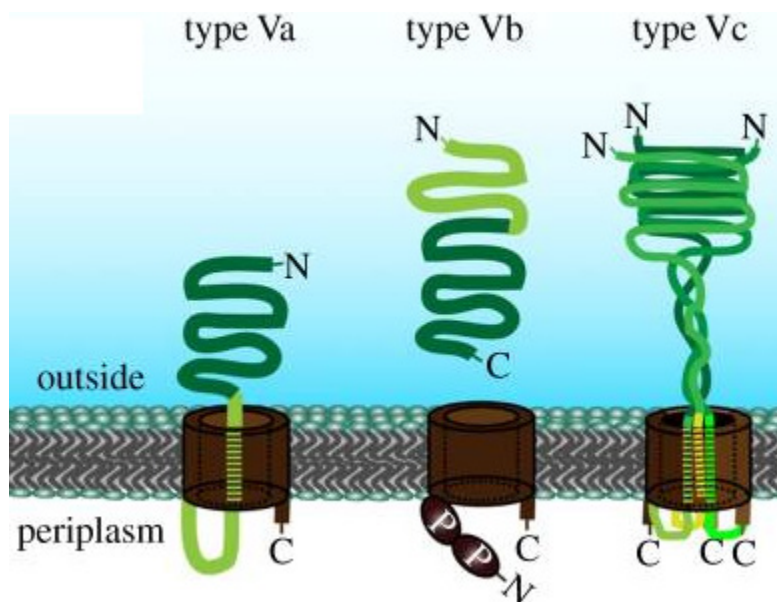


Figure 2 : Structure des systèmes de sécrétion type V. Les trois principales voies de biosynthèse des autotransporteurs sont montrées, soit classique (Va), à deux partenaires (Vb) et trimérique (Vc). Adapté de Leo et collaborateurs, 2012⁷³.

4.2 Caractérisation de AIDA-I

La biosynthèse de AIDA-I est réalisée par le système de sécrétion Va. Protéine membranaire mature de 100 kDa (145 kDa avec son domaine translocateur), elle est soumise à un clivage autocatalytique extracellulaire mais reste associée au tonneau β via une liaison non covalente⁷⁷. Le rôle de ce clivage n'est pas encore bien compris, mais l'on pourrait spéculer que le domaine passager pourrait être relâché de la surface bactérienne pour permettre, par exemple, de moduler les fonctions de AIDA-I durant l'infection. AIDA-I permet l'adhésion saturable⁷⁸ de *E. coli* K-12 à une panoplie de types cellulaires, dont HEP-2 (larynx), HeLa (cervical), HRT18 et CaCo-2 (entérocytes) ou CHO (ovaires de hamster), ce qui implique que le récepteur cellulaire auquel AIDA-I s'associe est présent sur ces différents types cellulaires⁷⁸. En amont du gène *aidA* est retrouvé *aah*, encodant une heptosyltransférase catalysant une O-glycosylation de AIDA-I. Cette glycosylation est nécessaire pour permettre la fonction d'adhésion de AIDA-I, peut-être en stabilisant la conformation de la protéine⁷⁹. En plus d'être une adhésine, les *E. coli* de laboratoire exprimant AIDA-I forment des biofilms et autoagrègent fortement. On retrouve même, à très faible niveau, une invasion actine dépendante des HEP-2⁸⁰. Il est intéressant de mentionner que ces fonctions sont indépendantes les unes aux autres. Une étude de notre laboratoire a montré que des mutations ponctuelles

dans le domaine passager de la protéine peuvent empêcher l'agrégation, l'invasion, l'adhésion ou la formation de biofilm sans avoir aucun effet sur les autres, impliquant que AIDA-I est composée de modules fonctionnels⁸⁰.

AIDA-I est un membre des SAATs (self-associating autotransporter). Les SAATs sont des autotransporteurs composés d'un nombre différents d'une répétition spécifique imparfaite de 19 acides aminés dans leur domaine passager⁸¹. En plus de AIDA-I, les SAATs les plus étudiées sont TibA et Ag43 chez *E. coli*, mais une étude récente de notre laboratoire a identifié une quantité étonnante de SAATs chez une panoplie de bactéries Gram négatives. TibA et Ag43 partagent également les fonctions connues de AIDA-I.

4.3 Les récepteurs cellulaires putatifs

Dû à la haute prévalence de l'adhésine AIDA-I dans les souches de ED-PWD ainsi qu'à son association fréquente avec d'autres facteurs de virulence de *E. coli*, tant des facteurs de colonisation que des toxines de plusieurs pathotypes, deux études ont tenté d'identifier le récepteur cellulaire que AIDA-I reconnaît.

4.3.1 Les récepteurs candidats publiés

La première étude a été réalisée par Laarman et Schmidt en 2003⁸². Ils ont premièrement traité des cellules épithéliales HeLa avec de la protéinase K et ajouté de l'AIDA-I purifiée à ces cellules. Ils ont remarqué que la liaison de AIDA-I aux cellules avait diminué de 20%, indiquant que le récepteur cellulaire impliqué est de nature protéique. À partir d'un lysat de cellules HeLa et par co-immunoprécipitation avec du AIDA-I purifiée, ils ont isolé une protéine d'environ 119 kDa dans la fraction membranaire des cellules. Après caractérisation biochimique, cette protéine était en fait une glycoprotéine *N*-glycosylée de pI 5,2 exprimée à la surface cellulaire. Mais avec ces seules caractéristiques, la nature du récepteur putatif de AIDA-I n'a pas pu être identifiée.

La seconde étude a été réalisée par l'équipe de Fang et collaborateurs⁸³. Puisque les *E. coli* exprimant AIDA-I sont retrouvés sous une forme de strates formant un biofilm associé au mucus intestinal des porcelets infectés, AIDA-I pourrait reconnaître une protéine ou une autre

composante du mucus qui lui permettrait d'y adhérer. De ce fait, l'équipe a identifié deux protéines potentielles, p65 et p120, via une colonne d'affinité de AIDA-I à partir de mucus intestinal porcine recueilli. Par spectrométrie de masse, l'identité du candidat p65 n'a pas pu être trouvée mais p120 pourrait être attribué à l'IgG Fc binding protein, une protéine sécrétée par les entérocytes. D'autres protéines ont été identifiées à partir de p120, dont les DNA damage binding protein et splicing factor 3b. Par contre, ces protéines sont de nature intracellulaire à comparer au premier candidat mentionné, donc ces possibilités ont été exclues par les auteurs.

4.3.2 Un nouveau récepteur identifié?

Un problème avec ces deux études est que l'identité des récepteurs de AIDA-I putatifs n'est pas bien confirmée. D'autre part, les candidats découverts dans le mucus intestinal porcine reflètent une adhésion des *E. coli* AIDA-I positifs avec cette composante et ne peut expliquer également l'adhésion aux diverses cellules dans les multiples expériences *in vitro*. Ces deux études n'ont pas caractérisé l'interaction AIDA-I / récepteur putatif au niveau des protéines isolées. Finalement, l'importance de ces récepteurs candidats n'a pas été évaluée dans les différents processus conférés par AIDA-I, dont l'adhésion à plusieurs types cellulaires *in vitro* et dans le phénomène d'invasion, retrouvés chez les *E. coli* K-12 exprimant AIDA-I.

Notre laboratoire a donc tenté d'identifier d'autres récepteurs candidats pour AIDA-I. L'hypothèse de projet était la suivante : le sérum est un milieu très riche en molécules de la matrice extracellulaire et de ces précurseurs⁸⁴, composantes qui sont reconnues par plusieurs adhésines autotransporteurs. Entre-autres, *Haemophilus influenzae*⁸⁵, *Proteus mirabilis*⁸⁶ et *E. coli*⁸⁷ peuvent adhérer aux fibronectine, laminine et collagène I et IV via Hap, TaaP et UpaG respectivement, et cette adhésion semble critique pour leurs interactions avec l'hôte. Il serait donc possible qu'AIDA-I puisse reconnaître une molécule de la matrice extracellulaire présente dans le sérum porcine pour permettre le processus d'adhésion, molécules également exprimées par les entérocytes⁸⁸. À l'aide de la résonance plasmonique de surface et d'ELISA, il a été démontré que AIDA-I purifiée peut se lier au sérum porcine bouilli (Mélissa René, données non publiées). Notre laboratoire a donc testé l'interaction entre AIDA-I purifié et différentes composantes de la matrice extracellulaire. Étonnamment, AIDA-I n'a pas montré

de liaison aux collagènes III-V, mucines type II et III, et les fibronectines humaine ou bovine, indiquant que AIDA-I interagit avec une molécule du sérum porcin autre que la matrice extracellulaire, ou d'autres composantes de la matrice non testées.

Afin d'identifier une protéine du sérum porcin avec laquelle l'adhésine AIDA-I peut interagir, deux méthodes de chromatographie ont été employées. Des billes enrobées de AIDA-I purifiée ont été produites, utilisées pour créer une colonne d'affinité, et le sérum porcin bouilli a été mis en contact avec cette colonne. Après élution de la colonne et séparation par SDS-PAGE, deux protéines candidates ont été identifiées par spectrométrie de masse : une bande IgM (75 kDa) et l'apolipoprotéine A-I porcine (~ 25 kDa). Pour confirmer ces résultats, un fractionnement du sérum porcin a été réalisé à l'aide d'une colonne d'échangeuse d'anion suivi par une séparation par poids moléculaire. Les fractions produites ont été testées pour leur interaction avec AIDA-I purifiée en ELISA et a identifié trois bandes sur SDS-PAGE : une bande correspondant à l'apolipoprotéine CIII porcine (10 kDa) et deux correspondant à l'apolipoprotéine AI porcine. L'apolipoprotéine AI porcine (ApoAI) étant une protéine retrouvée dans les deux approches de chromatographie, elle devient une candidate intéressante d'interaction avec AIDA-I pour poursuivre la caractérisation du possible récepteur. L'ApoAI pourrait directement interagir avec AIDA-I pour permettre aux *E. coli* AIDA-I positifs d'adhérer aux diverses cellules intestinales, permettant la colonisation du colon des porcelets afin de produire la ED et la PWD. L'ApoAI, tout comme les autres apolipoprotéines sont des protéines avec des rôles, activités métabolique et structures uniques. Avoir retrouvé cette protéine comme récepteur putatif d'AIDA-I a été surprenant puisque cette protéine intervient normalement dans le transport du cholestérol et une interaction entre cette apolipoprotéine et les bactéries est très peu documentée. La prochaine section décrira les apolipoprotéines.

5.0 Les apolipoprotéines et lipoprotéines

Les apolipoprotéines sont une large classe de protéines possédant une haute affinité envers les lipides. Jusqu'à ce jour, les apolipoprotéines A à R sont connues, et certaines de ces apolipoprotéines sont sous-classées, par exemple, les ApoAI-V. Ces protéines possèdent plusieurs fonctions et s'associent exclusivement avec les lipides ou lipoprotéines⁸⁹. Elles serviront, entre-autres, à la genèse des différentes lipoprotéines, leur maturation et leur

structure en leur conférant certains lots de caractéristiques uniques qui leur permettront d'assurer les rôles de ces dernières dans plusieurs activités physiologiques, dont la principale est l'assimilation du cholestérol, son efflux des cellules, son transport dans l'organisme et sa sécrétion⁸⁹. En réalité, le cholestérol n'est pas la seule molécule transportée dans les lipoprotéines mais également des triglycérides (TG) et phospholipides (PL) de la membrane cellulaire⁹⁰. Ce système de transport pourrait être comparé à un train : dans cette analogie, un wagon et son chargement représenteraient les lipoprotéines et le cholestérol/TG/PL respectivement, et le train, les apolipoprotéines. Dans ce cas, le train arrive à différentes stations et est chargé d'un produit accumulé qui devra être déchargé à d'autres stations en demande. Ce système a deux volets : le premier, un transport de ces molécules des cellules épithéliales et des macrophages jusqu'au foie (reverse cholesterol transport, RCT) et le second, un transport dans la direction opposée (forward cholesterol transport, FCT) qui permettront une homéostasie des niveaux de cholestérol, TG et PL dans l'organisme⁹⁰. Ce transport du cholestérol/TG/PL est réalisé via une très forte affinité des apolipoprotéines aux lipides et au cholestérol, constituants majeurs des lipoprotéines. Finalement, les apolipoprotéines interviennent aussi dans d'autres étapes, soit dans le développement de l'embryon durant l'état blastocystaire, où le rôle des apolipoprotéines fortement sécrétée reste inconnu⁹¹, et dans l'immunité passive des infections virales^{92,93} et bactériennes⁹²⁻⁹⁵. Cette section décrira les propriétés des principales apolipoprotéines ainsi que leurs associations aux différentes lipoprotéines qui sont les lipoprotéines à haute densité (HDL), à faible densité (LDL et VLDL) et les chylomicrons (CM).

5.1 Représentation des apolipoprotéines chez les organismes vivants

Les apolipoprotéines sont si importantes qu'on les retrouve chez un grand nombre d'être vivants dans différentes classes, que ce soit des mammifères⁹⁶, amphibiens^{96,97}, reptiles^{96,98}, oiseaux^{96,99} et poissons^{96,100}. Dans ces classes, les chercheurs affirment que tous les organismes les produisent. En 2008, Charron *et al* ont découvert le premier orthologue d'une apolipoprotéine, l'apolipoprotéine D, chez la plante *Arabidopsis thaliana*, nommé AtTIL¹⁰¹. Ils ont démontré que le rôle de cet orthologue est une protection contre le choc oxydatif. L'inactivation du gène dans cette plante a causé une accumulation toxique de peroxyde

d'hydrogène et autres ROS (reactive oxygen species). Dû à la haute affinité des apolipoprotéines envers les lipides et le rôle de AtTIL chez *A. thaliana*, les auteurs estiment que cette protéine pourrait avoir un rôle dans l'élimination des lipides oxydés dans les membranes des cellules végétales. Des protéines orthologues sont aussi retrouvées chez des invertébrés, comme les insectes¹⁰²⁻¹⁰⁴ et les crustacés¹⁰⁵. Jusqu'à tout récemment, les apolipoprotéines semblaient être exclusivement retrouvées dans le règne animal. Chez la bactérie *Rhodococcus* sp. RHA1, les triacylglycérols synthétisés sont emmagasinés dans des «lipid droplets»¹⁰⁶, également rencontrés chez les eucaryotes. Une équipe les a purifiés et a procédé à une étude protéomique¹⁰⁶. Plus de 228 protéines associées y ont été détectées, dont une, ro02104, que les auteurs ont qualifié d'«apolipoprotein-like», essentiel à la bonne formation des «lipid droplets». Cette étude a été la première à découvrir une protéine s'apparentant aux apolipoprotéines eucaryotiques chez les procaryotes et il est probable d'en retrouver chez d'autres bactéries. Puisque les apolipoprotéines sont retrouvées chez plusieurs organismes vivants, soit procaryotes ou eucaryotes, que les lipides ont un rôle primordial dans la biosynthèse cellulaire des lipides et que les apolipoprotéines ont une forte affinité envers ces lipides, cela démontre l'importance de ces protéines chez l'organisme.

5.2 L'apolipoprotéine AI dans les HDL

L'ApoAI mature est une petite protéine de 28kDa, protéine majoritaire des HDL et composante primordiale dans le transport inverse du cholestérol (RCT)⁹⁰. L'ApoAI et les HDL retrouvées dans le sang sont produits en quasi-totalité par le foie et l'intestin¹⁰⁷ mais on retrouve également une faible sécrétion au niveau de l'endothélium du cerveau¹⁰⁸ et des poumons¹⁰⁹. Préalablement synthétisée sous forme de prépro-ApoAI, elle sera modifiée post-traductionnellement dans les cellules la sécrétant, en clivant 18 acides aminés N-terminaux permettant sa sécrétion extracellulaire¹¹⁰. La protéine nouvellement sécrétée fera face à un dernier clivage extracellulaire médié par la métalloprotéase BMP-1¹¹¹ pour produire l'ApoAI mature. Le rôle exact de ce clivage reste encore à être élucidé, mais pourrait permettre d'augmenter l'interaction ApoAI-lipide. En fait, le clivage pourrait activer la protéine seulement lorsqu'elle est retrouvée hors du milieu cellulaire puisque la forte interaction ApoAI-lipide pourrait être défavorable dans le cytoplasme¹¹⁰. L'ApoAI a pour

fonction d'enlever le cholestérol et d'autres lipides en excès des cellules via les HDL, pour permettre leur excrétion⁸⁹.

5.2.1 Les HDL

Les HDL, couramment appelés le «bon cholestérol», possèdent un rôle anti-athérogénique, c'est-à-dire qu'ils empêchent l'épaississement de la paroi des artères causée par le dépôt de lipides. Ils sont utilisés pour prédire des risques d'accident cardiovasculaire¹¹². Ces lipoprotéines sont les plus petites du sang et sont très hétérogènes : leur nomenclature dépend de leur taille (5,4-12,9 nm), leur forme (discoïdale pour les pré β -HDL et sphérique pour les HDL₁₋₃), leur charge de surface et leur composition en lipides, cholestérol et en apolipoprotéines (ApoAI,II,IV, apolipoprotéines CI-III et E)⁸⁹. Les lecteurs sont amenés à lire une revue récente sur ce sujet¹¹³, mais seules les pré β -HDL et les HDL₁₋₃ seront traitées. Les différents sous-types de HDL sont composés d'un nombre fixe de molécules lipidiques et leurs compositions ont été déterminées chez certains. Les HDL₂ sont constitués de 137 phospholipides, 50 molécules de cholestérol non estérifiés («libres») (FC), 90 cholestérols estérifiés et 19 triacylglycérols à comparer aux HDL₃ composés de 51 phospholipides, 13 cholestérols libres, 32 cholestérols estérifiés et 9 triacylglycérols¹¹⁴. Les HDL sont des structures en constantes modifications : elles sont hautement dynamiques grâce à, principalement, l'ApoAI. Ce remodelage est effectué par les acteurs du RCT via cette protéine.

5.2.1.1 Le transport inverse du cholestérol

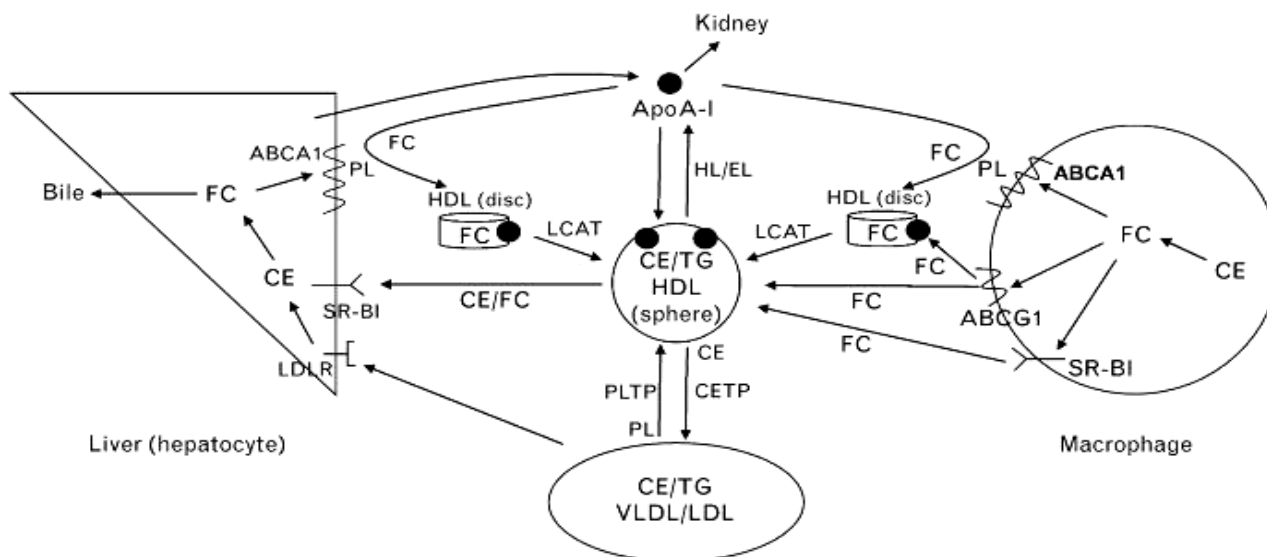


Figure 3 : Représentation schématique du transport inverse du cholestérol. L'ApoAI sécrétée par le foie et l'intestin est lipidée par ABCA1 des macrophages produisant un HDL naissant. Le cholestérol libre (FC) des pré-HDL produits est estérifié par l'action de LCAT et permet la sphérification des particules discoïdales. L'efflux du cholestérol continue vers ces transporteurs via ABCG1 et SR-B1 pour que les HDL soient délivrés aux hépatocytes par SR-B1 et LDLR afin que le FC soit excrété dans la bile. PLTP et CETP promeuvent un échange de lipides et de cholestérols estérifiés entre les VLDL/LDL et les HDL sphériques. Les lipases hépatiques (HL) et endothéliales (EL) participent à la délipidation d'ApoAI. Les VLDL et LDL produits participent également l'excrétion du cholestérol en s'associant avec LDLR. ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; ABCG1, ATP-binding cassette transporter G1; ApoAI, Apolipoprotéine A-I; CE, Cholestérol estérifié; CETP, Cholesteryl ester transfer protein; FC, Cholestérol libre; HDL, High density lipoprotein; HL, hepatic lipase; LCAT, Lecithin-cholesterol acyltransferase; LDL, Low density lipoprotein; LDLR, LDL receptor; PLTP, Phospholipid transfer protein; SR-B1, Scavenger receptor class B type 1; TG, Triacylglycérol; VLDL, Very low density lipoprotein. Adapté de Rothblat G. H., Phillips M.C., 2010⁸⁹.

Comme précédemment mentionné, le transport inverse du cholestérol (RCT) effectue le transport du cholestérol des cellules périphériques au foie pour sa sécrétion (Figure 3). Les cellules périphériques sont les donneurs secondaires de cholestérol et de lipides : en fait, les macrophages sont les cellules primaires stockant le cholestérol estérifié excédentaire^{115,116}. Lorsque ces cellules deviennent très chargées en ester de cholestérol (CE), où la balance de l'efflux de cholestérol via le transport inverse du cholestérol n'est pas suffisant, elles se différencient pour devenir les «foam cells»¹¹⁵. Ces «foam cells» sont les agents de l'athérosclérose¹¹⁷, une hypercholestérolémie. Elles se déposeront sur les artères, et, à long

terme, provoqueront des lésions artérielles par inflammation aiguë¹¹⁸, les obstruer par la formation de plaque et causer un accident cardiovasculaire¹¹⁹.

5.2.1.1.1 Biogénèse des HDL naissants

Pour transporter ce cholestérol, il faut d'abord que les HDL soient produits. La biogénèse des HDL débute avec la synthèse de l'ApoAI mature libre, non lipidée, par le foie/intestin (Figure 4). L'ApoAI nouvellement synthétisée, tout comme l'ApoAI pauvre en lipides recyclée de précédentes vésicules lipidiques, interagit avec une protéine de surface des macrophages / cellules périphériques nommée ATP-binding cassette transporter A1 (ABCA1)¹²⁰ pour permette le recrutement des phospholipides (PL), triglycérides (TG) et le cholestérol libre (FC) de la membrane des cellules donneuses vers l'ApoAI¹²¹ (figure 3). Plusieurs études ont démontré que l'incubation d'ApoAI libre avec les cellules exprimant ABCA1 provoquait directement la formation de plusieurs particules de HDL et de grosseurs variées (7-20 nm)^{120,122,123}, dont la majorité est de 9-12 nm représentant les préβ-HDL discoïdaux^{124, 122}. Un phénomène inverse est retrouvé chez les hommes atteints de la maladie de Tangier, une déficience d'ABCA1 d'ordre génétique. Dans le cas de ces personnes, les HDL sont virtuellement indétectables dans le sang, causant une accumulation de cholestérol estérifié dans les tissus menant à une apparition très rapide et prématurée d'athérosclérose¹²⁵. Un modèle murin de la maladie de Tangier a été développé et, lorsque ABCA1 est sélectivement surexprimé chez les macrophages murins, le niveau de HDL augmente succinctement¹²⁶ permettant le ralentissement de la progression des plaques athérosclérotiques¹²⁷ et un rétablissement de l'efflux du cholestérol vers l'ApoAI¹²⁶. Ces modèles *in vitro* ou *in vivo* d'expression de ABCA1 montre le rôle pivotale de cette protéine dans la biogénèse des HDL via l'ApoAI.

Il est important de mentionner que le cholestérol, chez les cellules donneuses, est stocké sous forme estérifiée. Sous cette forme, le cholestérol ne peut être transféré par la protéine ABCA1 vers l'ApoAI pour synthétiser une particule de HDL naissante. Certaines enzymes intracellulaires vont catalyser une hydrolyse qui permettra de détruire cette liaison ester pour devenir une molécule de cholestérol libre. Ces enzymes, dont NCEH1 et CES1, ont un rôle important dans la RCT^{128,129}.

Le mécanisme de lipodation d'une molécule d'ApoAI par ABCA1 n'est pas encore bien compris. Un premier modèle, défini par Chambenoit et collaborateurs en 2007, ne décrit pas une interaction moléculaire directe entre ABCA1 et ApoAI à la surface cellulaire, mais plutôt une association de l'ApoAI à cette membrane¹³⁰. Dans ce cas, ABCA1 confère une compétence de surface à l'ApoAI en remaniant la membrane plasmique. Ce changement produit une microsolvubilisation lipidique spatiale et temporelle favorable à l'ancrage de l'ApoAI qui participera au chargement de ces lipides par forte affinité¹³⁰⁻¹³². Ce modèle est en accord avec les modèles murins de la maladie de Tangier, c'est-à-dire que la fonction de ABCA1 est exclusive : lorsque son domaine ATPase est déficient et ne peut plus remanier le microenvironnement membranaire, aucun transfert de lipide n'est retrouvé et donc, aucun HDL naissant n'est synthétisé¹³⁰. En fait, ABCA1 permet d'entretenir la membrane cellulaire en transférant les phospholipides et cholestérol du feuillet interne vers le feuillet externe^{133,134}. L'étude de Chambenoit ainsi que les autres études supportant ce modèle^{130,131,135} ne retrouvent pas l'interaction directe entre ABCA1 et l'ApoAI que d'autres études ont relaté par co-immunoprécipitation/pontage chimique^{136,137} et par mutagenèse d'ABCA1¹³⁸. Un autre modèle de lipodation implique la formation d'un complexe intime entre ABCA1 et ApoAI, nécessaire mais non suffisant pour permettre l'efflux de cholestérol^{137,139}. Cette première étape permet une localisation de l'ApoAI centrée sur les microdomaines membranaires produits par ABCA1. Par la suite, les hélices- α C-terminales hydrophobiques de l'ApoAI rapprochée de la membrane s'insèrent dans la bicouche lipidique perturbée et l'extrusion de ces lipides/cholestérol a lieu pour produire une vésicule de pré β -HDL¹⁴⁰. Il a été démontré que ABCA1 et l'ApoAI colocalisent avec des marqueurs endocytiques comme Rab5/clathrine¹⁴¹ et transferrine¹²¹, et ce, dans les mêmes endosomes. Également, environ 30% de l'ApoAI nouvellement internalisée est rapidement resécrétée par une voie Rab4 dépendante^{121,141}. Lorsque les voies de l'endocytose sont court-circuitées par des drogues, l'efflux de cholestérol diminue¹⁴¹. Ces observations suggèrent que l'interaction entre l'ApoAI et ABCA1 induit une internalisation du complexe, où un HDL naissant est synthétisé et rapidement largué dans le milieu extracellulaire via rétroendocytose¹⁴². Ce dernier modèle dans la lipodation de l'ApoAI est encore contesté¹²¹.

5.2.1.1.2 Maturation des HDL

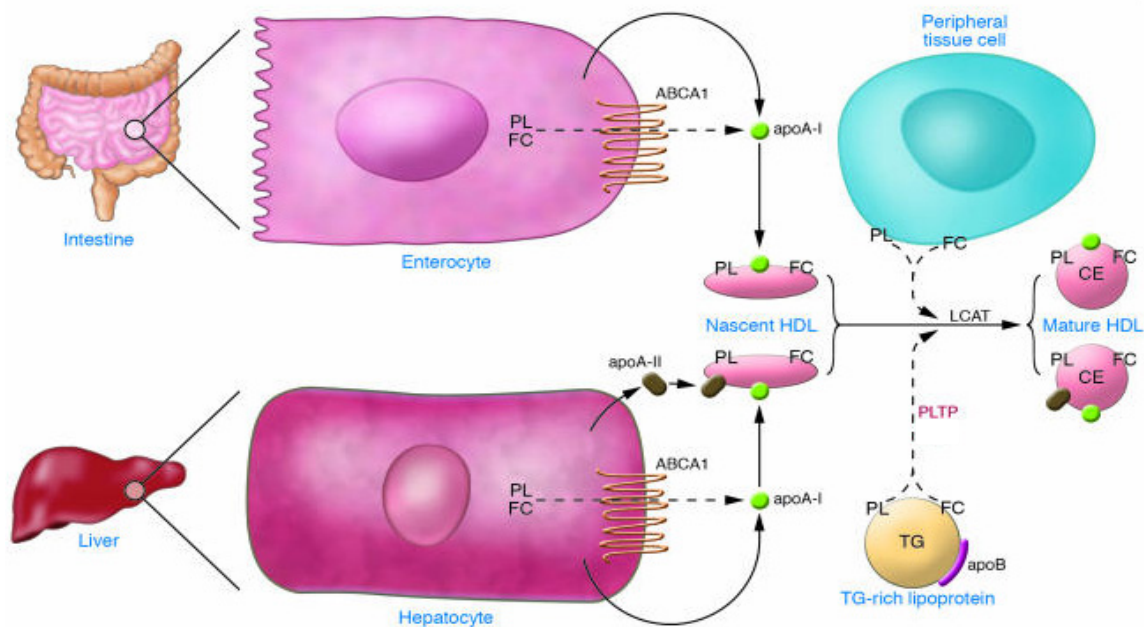


Figure 4 : Biogénèse et maturation des HDL. Les entérocytes et hépatocytes synthétisent l'ApoAI libre et sera rapidement lipidée par l'action d'ABCA1, produisant un pré β -HDL, en disque, contenant du FC et PL sur sa membrane. Ce FC, via l'action de l'enzyme sérique LCAT, est rapidement estérifié et migre vers le noyau du HDL, modifiant sa structure discoïdale vers une forme sphérique. Les HDL₁₋₃ ainsi produits sont dits matures, et permettent le transport davantage de cholestérol, en forme estérifié, dans le transport inverse du cholestérol. L'enzyme PLTP permet le transfert de TG des VLDL/LDL (lipoprotéine riche en TG) vers les HDL sphériques, participant à leur maturation. ABCA1, ATP-binding cassette transporter A1; ApoAI, apolipoprotéine A-I; CE, cholestérol estérifié; FC, cholestérol libre; LCAT, Lecithin-cholesterol acyltransferase; PL, phospholipides; PLTP, phospholipid transfer protein; TG, triglycérides. Adapté de Rader et *al.*, 2006¹⁴³.

Suite à leur biogénèse, les pré β -HDL produits par la microsolvubilisation de lipides membranaires, transférés à l'ApoAI libre/pauvre en lipide, devront subir une étape de maturation (Figure 4). Lors de cette maturation, les HDL naissants acquièrent davantage de triglycérides, phospholipides et cholestérols libres, passant d'une forme discoïdale à sphérique. Ce remodelage des HDL discoïdaux est effectué via une enzyme sérique, la lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT). Durant la manipulation de l'architecture de ces HDL naissants, l'enzyme LCAT catalyse une estérification du cholestérol libre situé à la surface de ces particules¹⁴⁴. Les cholestérols estérifiés, fortement hydrophobes, migrent alors vers le noyau hydrophobe du HDL et provoque une sphérification des particules discoïdales¹⁴⁵. Ceci leur permet de grossir et de transporter une plus grande quantité de

cholestérol libre dans leur membrane, mais également de stocker le cholestérol dans le noyau des HDL matures. Le ciblage et l'activation de cette enzyme vers les HDL ont été attribués exclusivement à l'ApoAI, où une liaison directe entre ces deux protéines a été démontrée¹⁴⁶. Au cours du processus de maturation médiée par LCAT, les HDL₃, les plus petits HDL sphériques, sont produits pour devenir des HDL₂ et HDL₁, plus gros, transportant jusqu'à 633% plus de cholestérols estérifiés¹⁴⁷. Des études compositionnelles des HDL ont montré que, dans les HDL reconstitués (rHDL) discoïdaux, 2 particules d'ApoAI les composent¹⁴⁸. Ce nombre augmente à 3-4 dans les rHDL sphériques après estérification du cholestérol¹⁴⁹. Il faut aussi noter que LCAT possède une plus grande affinité envers les particules sphériques que discoïdales¹⁴⁷. Ces observations suggèrent que l'ApoAI permet l'augmentation de la grosseur et de la masse des pré β -HDL par l'intermédiaire de LCAT et mènera, au final, à un gain d'ApoAI et de cholestérol estérifié dans les HDL₁₋₃, des lipoprotéines sphériques plus grosses. Le groupe de Hui-hua et collaborateurs suggère que l'augmentation de l'affinité de LCAT envers ces HDL est causée par un changement de conformation dans l'ApoAI via l'augmentation de l'aire de surface des HDL sphériques et la présence supplémentaire de molécules d'ApoAI sur ces derniers¹⁴⁷.

Puisque l'efflux de cholestérol est un cycle homéostatique important des lipides/cholestérol au niveau cellulaire, il est capital que cet efflux soit contrôlé. Deux autres enzymes ont été identifiées comme étant des ligands pour l'ApoAI associée aux HDL sphériques, tout comme LCAT. Ces protéines, phospholipid transfer protein (PLTP) cholesteryl ester transfer protein (CETP), participent au recyclage des HDL et au transfert des triglycérides/phospholipides pour PLTP¹⁵⁰ et cholestérols estérifiés pour CETP¹⁵¹ entre les divers sous-types de HDL. Il en résulte une interconversion continue entre les HDL₁₋₃, un remodelage qui produit des particules de plus grandes et de plus petites tailles⁸⁹, critique pour le RCT¹⁵². Chez ces HDL plus petits, la diminution de l'aire de surface est associée à la désorption de l'ApoAI qui est relâchée dans le plasma¹⁵³. L'ApoAI recyclée dans la phase aqueuse peut alors recommencer un cycle de biogénèse des HDL naissant par ABCA1 ou s'associer avec d'autres HDL sphériques en maturation. Également, PLTP catalyse l'échange des lipides des lipoprotéines à faible (LDL) ou très faible densité (VLDL) vers les HDL₁₋₃¹⁵⁰. Ce transfert de lipides s'accompagne d'une perte de cholestérol estérifié des HDL sphériques vers les lipoprotéines

actrices du transport du cholestérol via CETP^{150,154}. Finalement, les HDL peuvent être déstabilisées par l'action de lipases hépatiques (HL) et endothéliales (EL) qui permettent le relâchement des molécules d'ApoAI associées à ces lipoprotéines¹⁵⁵.

Lorsque les différents sous-types de HDL sphériques sont générés, on distingue une augmentation dans la quantité de molécules de cholestérol libre à la surface des HDL plus gros dont les HDL₁₋₂ qui explique le gain de cholestérol estérifié dans le noyau de ces particules avec la cholesteryl ester transfer protein (CETP). Pour que cet événement se produise, il faut donc qu'il y ait perpétuation de l'efflux de cholestérol à partir des macrophages vers les HDL sphériques afin que le cholestérol libre soit accumulé dans ces vésicules. En fait, d'autres protéines exprimées à la surface de ces cellules ont montré une capacité à transférer le cholestérol libre vers les lipoprotéines (Figure 5) puisque l'inactivation de ABCA1, la protéine produisant les HDL via l'ApoAI, ne bloque pas l'interaction des HDL avec la membrane cellulaire, comme il est rencontré avec l'ApoAI libre¹⁵⁶. La première protéine, ATP-binding cassette transporter G1 (ABCG1), une protéine similaire à ABCA1, montre une capacité à stimuler l'efflux de cholestérol. Lorsque ce transporteur est inactivé dans les macrophages *in vitro*, on remarque une diminution de l'efflux de cholestérol expliqué par une suppression d'adhésion des HDL sphériques aux cellules¹⁵⁶. Aucune diminution d'interaction n'est observée avec l'ApoAI libre et ces cellules. Cette étude a montré que la formation du complexe HDL-ABCG1 n'est pas médiée par l'ApoAI, mais est fortement dépendante de son état de lipidation. Dans ce cas, les pré β -HDL et HDL₃ possèdent une affinité supérieure à ABCG1 que les plus grosses particules. ABCG1, tout comme ABCA1, participe à la microsolubilisation membranaire des lipides, permettant leur efflux aux HDL¹⁵⁶. L'inactivation de scavenger receptor class B type 1 (SR-B1), une autre protéine promouvant l'efflux de cholestérol, provoque les mêmes effets que l'inactivation d'ABCG1 dans la RCT¹⁵⁶. Contrairement à cette dernière, une interaction directe a été notée entre SR-B1 et l'ApoAI fortement lipidée¹⁵⁷. Cette association provoque un flux bidirectionnel de cholestérol libre, concentration dépendante, entre la cellule et les lipoprotéines de grandes tailles (HDL₂₋₃)¹⁵⁸.

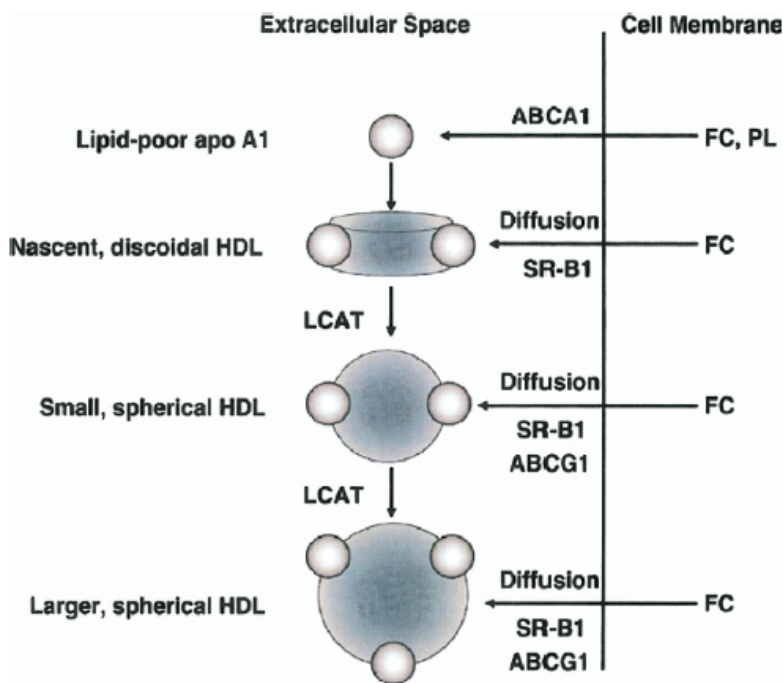


Figure 5 : Transfert du cholestérol des membranes cellulaires vers les HDL. Une vésicule discoïdale de HDL est produite par ABCA1 au niveau de la membrane de la cellule donneuse. Davantage de FC est transféré vers ces HDL et le FC à la surface du HDL est estérifié par l'action de LCAT. Le cholestérol estérifié migre vers le noyau des HDL et ceux-ci deviennent sphériques et grossissent. Lors du grossissement des HDL, les vésicules interagissent davantage avec SR-B1 (HDL discoïdaux et sphériques) et ABCG1 (HDL sphériques seulement) à la membrane des cellules donneuses pour que davantage de FC y soient transférés pour transporter encore plus de cholestérol. Adapté de Link et *al.*, 2007¹⁵⁹.

5.2.1.1.3 Excrétion du cholestérol dans la bile : reprise par les hépatocytes

Pour que les triglycérides, phospholipides, cholestérols libres et estérifiés soient excrétés dans la bile, les HDL matures en circulation doivent obligatoirement s'associer avec les hépatocytes. Cette association est causée par la forte expression de scavenger receptor class B type 1 (SR-B1). Il a été montré que cette protéine, en plus de participer au flux de cholestérol libre entre les cellules et HDL, pouvait également provoquer une absorption spécifique des triglycérides, phospholipides et cholestérols estérifiés transportés à la surface des HDL, mais également dans le noyau lipoprotéique via rétroendocytose^{157,160}. Il en résulte une dissociation complète ou partielle des particules de HDL qui permet la désorption de l'ApoAI lipidée, reprenant le cycle du RCT. D'autre part, une faible population des HDL s'associe à un autre récepteur majeur des hépatocytes nommé LDL receptor (LDLR) afin d'absorber leur contenu

et éliminer ces particules hors de la circulation sanguine¹⁶¹. Le contenu des HDL est finalement excrété par la bile retrouvé dans l'intestin et évacué dans les fèces.

Plusieurs études sur la sécrétion des apolipoprotéines ont démontré que les entérocytes de plusieurs animaux, dont les porcs, sécrètent l'ApoAI au niveau apical, *in vitro*^{162,163}, et dans le lumen intestinal, *in vivo*^{164,165}. Malgré que le rôle de la présence de cet ApoAI du côté apical des entérocytes ne soit pas connu puisque seul son rôle dans la circulation sanguine est étudiée, il semblerait que cette proportion significative de l'ApoAI soit importante dans l'excrétion du contenu des HDL. Tout récemment, l'équipe de Danielsen a proposé que cette fraction d'ApoAI participe dans l'efflux transintestinal du cholestérol¹⁶⁶. Ce dernier, dont les mécanismes d'action ne sont pas encore connus, permet le transfert du cholestérol directement entre le sang et le contenu intestinal sans l'intermédiaire du foie. Cette étude a montré que l'ApoAI, dans le lumen intestinal, se dépose sur les microvillosités des entérocytes et participeraient, par un mécanisme toujours inconnu, au transfert du cholestérol sanguin vers la lumière intestinale. Il est intéressant de mentionner que l'efflux transintestinal du cholestérol est deux fois plus important que la voie hépatique pour les stérols neutres chez la souris¹⁶⁷.

Somme toute, l'ApoAI est véritablement une plateforme de travail pivotale dans le RCT : elle permet le chargement des triglycérides, phospholipides et cholestérols libres afin d'assembler des HDL, contrôle le destin des particules de HDL durant les processus de maturation/restructuration et permet le relargage de leur contenu dans les hépatocytes ou l'intestin afin d'excréter ces constituants hors du corps.

5.2.2 Structure et conformations de l'ApoAI

Le rôle de l'ApoAI dans le transport inverse du cholestérol suggère une modification de la conformation de cette protéine pour médier l'interaction avec les différents ligands dans les étapes de lipidation, maturation et excrétion du cholestérol. Comme mentionné, entres-autres, les enzymes ABCA1 et LCAT possèdent des affinités différentes envers l'ApoAI selon son association avec les types de HDL. En lien avec ces observations, des anticorps contre plusieurs épitopes de l'ApoAI utilisés comme sondes de conformation ont montré une perte ou un gain d'affinité avec la protéine avec certains niveaux de lipidation, soit en utilisant des

détergents, des HDL₁₋₃ ou en délipidation par des lipases¹⁶⁸. Il a été montré que le domaine C-terminal de l'ApoAI libre est susceptible aux traitements protéolytiques tandis que le même domaine, lipidé, est résistant à l'action de la protéolyse suggérant que l'ApoAI est retrouvée en plusieurs états et subit un profond changement conformationnel selon la nature de son association avec les lipides¹⁶⁹. Plusieurs laboratoires se sont consacrés durant les dernières années à l'étude de ces conformations de l'ApoAI et est encore un sujet très actif. La structure et les conformations de l'ApoAI seront très brièvement discutées mais les lecteurs sont dirigés vers d'excellentes revues détaillées sur ce sujet^{170,171}.

5.2.2.1 ApoAI libre

Environ 5 à 10% de l'ApoAI synthétisée par le foie/intestin dans le sérum n'est pas associée aux HDL¹⁷². L'ApoAI libre est une protéine très riche en hélices- α amphiphatiques qui composent environ 50% de sa forme libre¹⁷³. Les études de cristallographie de l'ApoAI ont démontré qu'elle contient 8 hélices- α , dont la plus grande concentration se retrouve au côté N-terminal¹⁷⁴. En fait, 4 hélices- α amino-terminales contiennent les domaines récepteurs aux différents ligands de l'ApoAI dans le transport inverse du cholestérol et forment un paquet caractéristique (figure 6A)¹⁷⁴. Un second domaine fonctionnel de l'ApoAI se retrouve au côté C-terminal. Lorsque ce domaine est tronqué, l'association de l'ApoAI aux phospholipides est fortement réduite contrairement à une réduction absente pour le côté N-terminal, indiquant que le domaine C-terminal interagit avec les lipides¹⁷⁵. Des boucles non structurées prédominent dans cette région¹⁷⁶.

5.2.2.2 ApoAI liée aux HDL

Lors de l'association de l'ApoAI avec les phospholipides, d'importants changements conformationnels sont rencontrés dans le domaine C-terminal interagissant avec les lipides. On retrouve une transition des boucles non définies vers des hélices- α amphiphatiques¹⁷⁶. Leur contenu dans l'ApoAI lipidée augmente à environ 75%, dépendamment du niveau de lipidation de la protéine et permet le dépliement du paquet de 4 hélices- α ¹⁷³. Des études ont tenté de caractériser la structure tertiaire de l'ApoAI dans les pré β -HDL reconstitués. Ce sujet suscite encore une controverse quant à la véritable structure mais le modèle accepté est celui

de la «double ceinture». Ce modèle implique deux ou trois molécules d'ApoAI antiparallèles encerclant la vésicule discoïdale (figure 6B)¹⁷⁰. Huang et collaborateurs ont récemment déterminé la structure de l'ApoAI dans les HDL sphériques, à savoir une « cage pliée » ou en « trèfle » (figure 6C)¹⁷⁷. Cette dernière étude a montré que ce modèle proposé dans les HDL reconstituées était la structure rencontrée chez les HDL sphériques isolés du plasma. Finalement, il faut mentionner qu'un groupe a montré que les conformations de l'ApoAI libre ou lipidée montre des états intermédiaires réversibles lors de la transition entre les états libre et lipidée, ou vice-versa¹⁷⁴. La capacité de l'ApoAI à s'interconvertir entre les différentes conformations implique qu'elle est hautement dynamique et flexible afin d'accommoder les différents sous-types de HDL.

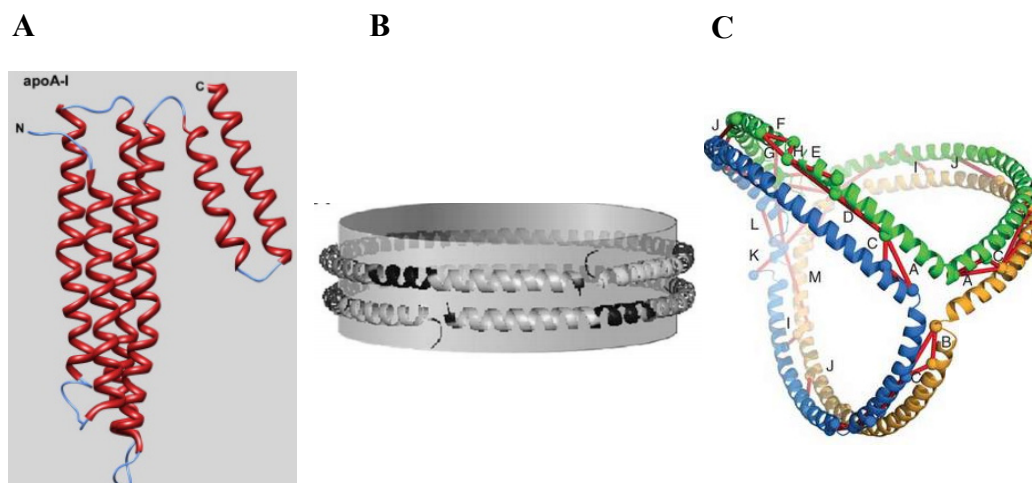


Figure 6 : Modélisation des trois conformations associées à l'ApoAI selon les degrés de lipidation. A. Structure cristallographiée des six premières hélices- α N-terminales de l'ApoAI libre, adaptée de Vasanthy *et al*, 2010¹⁷⁸. B. Modèle de la «double ceinture» dans les HDL discoïdaux, adapté de Lund-Katz et Phillips, 2010¹⁷⁰. C. Modèle en trèfle dans les HDL sphériques, adapté de Huang *et al*, 2010¹⁷⁷

5.3 Les autres lipoprotéines majeures.

Outre les HDL, les lipoprotéines à faible densité (VLDL/LDL) et les chylomicrons (CM) jouent un rôle pivotale dans le transport du cholestérol. Ces lipoprotéines sont composées par d'autres ensembles d'apolipoprotéines différentes de l'ApoAI, tous synthétisées par le foie et l'intestin, qui leur confèrent des structures et des caractéristiques différentes aux HDL.

5.3.1 Les lipoprotéines à faible densité (VLDL et LDL)

L'apolipoprotéine B (ApoB) est la composante primaire des VLDL et des LDL. En fait, l'ApoB est pour ces lipoprotéines ce que l'ApoAI est pour les HDL. Elle permettra d'assurer la synthèse intracellulaire hépatique des VLDL dans le réticulum endoplasmique via la microsomal triglyceride transfer protein¹⁷⁹. L'ApoB permet également la maturation des VLDL extracellulaire vers les LDL. Les LDL sont des vésicules pauvres en triglycérides et très riches en cholestérols estérifiés¹⁸⁰. Les VLDL/LDL sont les réservoirs principaux du cholestérol estérifié, étant des lipoprotéines hautement hétérogènes et énormes. Leurs grosseurs varient entre 18 et 27 nm, conférées par une seule molécule d'ApoB par vésicule¹⁸¹. Ces lipoprotéines ont un rôle important dans l'excrétion du cholestérol par le transport inverse du cholestérol, puisque l'ApoB permet l'élimination des LDL et VLDL en s'associant avec le récepteur à LDL (LDLR) exprimé chez les hépatocytes, consommant ces particules pour évacuer le cholestérol et les lipides hors circulation (Figure 3)¹⁸². L'ApoB, via les LDL et les VLDL, participe également au transport du cholestérol. Dans ce contexte, les cellules périphériques absorbent le contenu lipidique et cholestérols estérifiés de ces lipoprotéines par endocytose du complexe LDL-LDLR¹⁸². Ces lipoprotéines sont aussi rapidement éliminées de la circulation par les macrophages via un mécanisme inconnu et promeuvent leur différenciation en « foam cells »¹⁸³. Dans ce sens, il a été montré qu'une diète riche en gras chez les souris permet l'accumulation exacerbée du cholestérol estérifié dans les macrophages via les VLDL/LDL, menant à un développement d'athérosclérose rapide¹⁸⁴. Une autre hypothèse de l'apparition des « foam cells » implique des LDL oxydés, via l'action d'effecteurs inconnus, qui sont rapidement éliminés par les macrophages et les différencient¹⁸⁵.

5.3.2 Les chylomicrons (CM)

Les CM sont les transporteurs unidirectionnels des lipides, vitamines liposolubles et cholestérol diététiques absorbés par les entérocytes vers les hépatocytes/adipocytes¹⁸⁶. Composées à 98% de triglycérides et de phospholipides, ces vésicules sont caractérisées par une combinaison unique d'apolipoprotéines, incluant les ApoA1, ApoB, ApoC et ApoE¹⁸⁷. En fait, une forme unique de l'ApoB tronquée (ApoB48) est présente chez les CM, exclusivement

synthétisée par l'intestin, caractérisée par l'absence de son domaine d'interaction au récepteur à LDL (LDLR)¹⁸⁸. Via l'ApoE, les CM seront sujets à l'action de lipases sériques pour permettre leur absorption partielle au foie par endocytose¹⁸⁹. Cet évènement permettra la désorption de l'ApoE de leur surface. L'ApoE peut alors s'associer à une petite population de HDL₂₋₃, conférant la caractéristique à ces HDL d'interagir avec les LDLR hépatiques afin que leurs contenus lipidiques soient excrétés¹⁶¹. Les vestiges lipolysés des CM en circulation, ApoAI positifs, sont utilisés comme maquette de synthèse des préβ-HDL¹⁹⁰.

6.0 Étude de l'interaction AIDA-I - ApoAI

AIDA-I est une adhésine autotransporteur ayant un rôle important dans la colonisation des porcelets en phase du sevrage. Via sa fréquente isolation avec d'autres facteurs de virulence, les *E. coli* l'exprimant provoquent la ED ou la PWD menant à une atteinte grave des porcelets post-sevrés qui nuisent à leur croissance. Ces *E. coli* posent un problème mondial dans les fermes d'élevage porcin et aucun traitement n'existe, mise à part des méthodes préventives dont l'efficacité n'est pas prouvée.

De précédentes études ont confirmé les interactions ou trouvé des récepteurs putatifs pour AIDA-I, mais aucune d'entre-elle n'a étudié le rôle de ces protéines au niveau cellulaire. Quels sont les récepteurs cellulaires impliqués dans le phénomène d'adhésion cellulaire des *E. coli* exprimant AIDA-I? Une étude de notre laboratoire a suggéré l'ApoAI comme partenaire de liaison de AIDA-I. Puisque l'ApoAI est également synthétisée dans la lumière intestinale, celle-ci semble être un récepteur candidat intéressant pour AIDA-I puisque cette adhésine participe à la colonisation des *E. coli* dans le tractus intestinal des porcs infectés. La colonisation intestinale pouvant avoir lieu par le biais de l'interaction entre une *E. coli* AIDA-I+ et l'ApoAI intestinale, une infection pourrait se développer et ainsi produire la ED ou la PWD caractéristique. Nous pensons donc que l'ApoAI est un récepteur cellulaire qui permet aux bactéries AIDA-I+ d'adhérer aux entérocytes porcins. L'ApoAI étant une protéine retrouvée sous plusieurs formes, soit libre ou associée à des lipides comme dans les HDL, nous avons étudié l'interaction entre ces formes de l'ApoAI et AIDA-I. Se pourrait-il qu'AIDA-I puisse interagir avec ces différentes formes l'ApoAI? TibA, une autre SAAT, similaire à AIDA-I, pourrait-elle également se lier à l'ApoAI? Puisque l'ApoAI est sécrétée dans le milieu extracellulaire, comment est-ce qu'une bactérie exprimant AIDA-I interagit-elle

avec la cellule via l'ApoAI? La modulation de la sécrétion cellulaire de l'ApoAI affecte-elle l'interaction entre les *E. coli* AIDA-I+ et les cellules? Nous nous sommes donc penchés sur l'interaction AIDA-I – ApoAI au niveau protéique et cellulaire en condition d'infection *in vitro*.

MÉTHODOLOGIE

Souche bactérienne et plasmides. La souche de *E. coli* K-12 C600 (New England Biolabs) (F^- *thr-1 leuB6 thi-1 lacY1 supE44 rfbD1 fhuA21*) a été utilisée tout au long des expériences. Les plasmides pTRC99a, pAgH, pAg, pTgH, pTibCA et pRFP ont été utilisés. Les plasmides pAgH (pAg) et pTgH (pTibCA) permettent l'expression de AIDA-I et TibA matures, respectivement. Ces plasmides sont dérivés de pTRC99a et contiennent le gène codant l'autotransporteur (*aida* ou *tibA*) et sa glycosyltransférase spécifique (*aaH* et *tibC*, respectivement), sous le contrôle du promoteur *trc* inductible à l'isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG). AIDA-I et TibA exprimées par pAgH et pTgH sont marquées avec 6 résidus Histidine et d'une Glycine du côté N-terminal. Ce marquage n'altère pas les fonctions de ces protéines. Le plasmide pRFP est dérivé de pACYC184, et permet l'expression inductible de la protéine fluorescente mCherry sous le contrôle de l'IPTG.

Croissance bactérienne et culture cellulaire. Les bactéries contenant les plasmides mentionnés ont été cultivées dans le milieu Luria-Bertani (LB) sur pétri d'agar ou liquide, contenant $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'ampicilline et de $50 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de chloramphénicol, à 30°C . La croissance a été suivie par densité optique à 600nm. Lorsque les cultures ont atteints une DO_{600} de 0,8, $10 \mu\text{M}$ d'IPTG été ajouté pour permettre l'induction, si mentionnée. À noter que les promoteurs inductibles employés dans cette étude permettent une expression constitutive des protéines. Ces conditions sont adaptées pour limiter la toxicité associée à la surexpression de AIDA-I ou de TibA. Les cellules HEp-2 (ATCC CCL-23) ont été cultivées à 37°C avec 5% CO_2 en Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco) contenant 10 mM de pyruvate de sodium, 10% Bovine Growth Serum (BGS) ou sérum porcin inactivés (Gibco), $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'amphotéricine B (Fungizone), et $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de pénicilline/streptomycine (Gibco). Les cellules Hep G2 (ATCC HB-8065) ont été cultivées dans le même milieu mais en présence de 20% de sérum bovin fœtal (Gibco). Les cellules Caco-2 (généreux don du Dr. Dubreuil, Université de Montréal) ont été cultivées en Minimum Essential Media alpha, 20% de sérum bovin fœtal, 10 mM pyruvate de sodium, $2.5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ d'amphotéricine B (Fungizone), et $100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de pénicilline/streptomycine (Gibco). Lorsque mentionné, les Caco-2 ont été polarisées par l'utilisation de plaque 12 puits avec membranes collagène-PTFE $0,4 \mu\text{m}$ Transwell (Corning). Pour polariser ces cellules, 100 000 cellules ont été ajoutées aux puits. Un volume de 0,5 mL de MEM- α /antibiotique/pyruvate de sodium et 1,5 mL du même

milieu avec 20% sérum bovin fœtal sont ajoutés aux côtés apical et basolatéral, respectivement. Lorsque les Caco-2 ont formées une monocouche cellulaire à 100% de confluence, les milieux ont été remplacés et les cellules laissées en culture de 15-21 jours. Les milieux apicaux et basolatéraux ont été remplacés aux 2 jours, en portant une attention particulière à l'état de la monocouche chaque jour sous microscope. Après la période d'incubation, la viabilité et degré de polarisation des cellules ont été calculés par la résistance électrique transépithéliale (TER) à l'aide d'un voltohmmètre (Millipore). Une TER de 250 à 300 $\Omega \text{ cm}^2$ correspond à une polarisation totale des Caco-2.

Purification des protéines AIDA-I et TibA. Pour la purification de AIDA-I, 1 litre de culture de C600 comportant le plasmide pAgH ou pTgH a été cultivé jusqu'à une DO_{600} de 0,8 et induit avec 10 μM d'IPTG durant la nuit. Le litre de culture de C600 a été centrifugé et resuspendu dans 30 mL de TBS (50 mM Tris pH8, 150 mM NaCl) + inhibiteurs de protéases. Par la suite, les bactéries sont lysées par 3 cycles de French Press et de de sonication. Les bactéries non lysées et les déchets sont éliminés par centrifugation et les membranes internes et externes sont culottées par centrifugation à 16 000 x g pendant 45 minutes.

Le culot est resuspendu dans 30 mL de tampon d'extraction TBS, les membranes solubilisées par l'incubation de 2% Triton X-100 pendant 30 minutes et centrifugées à 250 000 x g 30 minutes afin de séparer la fraction soluble des membranes insolubles. La fraction soluble contient AIDA-I marqué avec le marqueur Histine.

Afin d'extraire TibA de la fraction membranaire isolée, au tampon d'extraction nous avons ajouté de l'EDTA à 10mM afin d'augmenter la solubilisation de TibA. Lorsque la fraction soluble incluant TibA avec le marqueur Histine est isolée, l'EDTA est éliminée sur une colonne de dessalage PD-10 (GE Healthcare Life Sciences) afin d'empêcher une interférence avec les prochaines étapes.

Les protéines sont purifiées sur un système ÄKTA Purifier avec une colonne His Trap HP de 1 mL (Amersham Biosciences) en accord avec les instructions du manufacturier en utilisant un tampon d'équilibre TBS + 1% Triton X-100 déshydrogéné et d'un tampon d'élution TBS + 1% Triton déshydrogéné + 1 M imidazole. Des échantillons des fractions isolées ont été

dénaturés à 100°C pendant 10 minutes dans un tampon de chargement SDS-PAGE 2x contenant du β -mercaptoéthanol, et la qualité de l'extraction a été évaluée par un gel de SDS-PAGE 10% coloré au bleu de Coomassie. Les fractions de AIDA-I ou TibA ont été concentrées avec le système de membranes Amikon Ultra 30K (Millipore), dialysées en TBS durant la nuit et solubilisées en TBS + 1% n-octyl- β -D-glucoside. Finalement, la concentration des protéines extraites a été dosée par la méthode du BCA Protein Assay (Pierce Biotechnology).

ELISA. Les essais d'ELISA ont été réalisés comme suit : Les sérums suivants ont été ajoutés aux puits de plaque 96 puits Maxisorp (Corning) : sérums bouillis porcins, bovin fœtal ou de bovin de croissance ou de cheval. Les sérums sont préalablement préparés en chauffant 1 mL à 100°C pendant 10 minutes. Ils sont ensuite centrifugés à 13 000 RPM 15 minutes dans une microcentrifugeuse de table. Les autres composantes testées ont été préparées en tampon phosphate salin (PBS) à 20 μ g/mL : les apolipoprotéines humaines A-I, B, C-I, C-II, C-III et E2 (Sigma). Un volume de 100 μ L est ajouté aux puits, en duplicata, à 4°C durant une nuit. Après un lavage au PBS, les puits ont été bloqués avec du TBS + 0,3% caséine, 2 heures à 37°C, suivi d'un lavage au PBS. Une solution de 100 μ L à 150 nM AIDA-I ou TibA purifiés, en TBS + caséine 0,3% + détergent (Tween 20 0,05% ou Triton 0,1 %) est ajoutée aux puits, 1h à 37°C. Afin de détecter une association AIDA-I ou TibA avec les puits, plusieurs lavages au PBS ont été faits suivis par l'ajout d'anticorps reconnaissant AIDA-I natif, dilué au 1 : 10 000 et d'un anticorps secondaire couplé à la horse radish peroxydase (HRP) dilué au 1 : 5000. L'anticorps contre AIDA-I reconnaît également TibA. Les complexes immuns ont été révélés 20 min en utilisant 100 μ L d'une solution de 3,3',5,5'-tetraméthylbenzidine par enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Sigma). Afin de stopper la réaction, 100 μ L d'acide sulfurique 1% a été ajoutée et la lecture des puits s'est réalisée à 450 nm.

L'ELISA en compétition s'est déroulée sous le protocole d'ELISA mentionné. Avant l'ajout de AIDA-I ou de TibA, ces protéines ont été préalablement incubées avec le compétiteur, soit l'ApoAI à 200 μ g/mL ou le sérum porcins bouilli, 1h à 37°C. Le reste de l'ELISA s'est déroulé comme précédemment expliqué.

Lysat total de bactéries Des cultures de nuit de C600 pAgH et pTRC ont été normalisées à $DO_{600} = 1$ en DMEM et $1 \mu\text{M}$ d'ApoAI a été ajoutée 3 h à 37°C . Après avoir bien lavé les bactéries au PBS, les bactéries ont été fixées au paraformaldéhyde 4%, 15 min à température pièce. Les échantillons ont été soumis au SDS-PAGE et à l'immunobuvardage, comme décrit plus bas.

SDS-PAGE et immunobuvardage de l'ApoAI. Les bactéries sont lysées et les protéines dénaturées par traitement thermique à 100°C , 10min en tampon de chargement SDS-PAGE 2x avec β -mercaptoéthanol. L'électrophorèse sur gel 10% a été effectuée et transférée sur membrane de polyfluorure de vinylidène (Millipore). La membrane a été bloquée avec le tampon de blocage (5% lait écrémé + 5% TNT) 1h température pièce. L'immunodétection de l'ApoAI a été réalisée avec l'anticorps monoclonal contre l'ApoAI humaine dilué au 1 :1000 (5F4F5, Abcam) pendant 1h. Un anticorps de chèvre contre la souris, conjugué à la HRP, dilué à 1 : 5000 dans le tampon de blocage, a été utilisé. Après lavage extensif, les complexes immuns ont été révélés avec la solution de 3,3',5,5'-tétraméthylbenzidine (Sigma).

Microscopie en immunofluorescence. Les cellules HEp-2 ont été cultivées en absence d'antibiotique jusqu'à confluence sur des lames à chambres Lab-Tek II (Nalge Nunc International). Le jour de l'infection, les cellules ont été lavées avec du PBS-CM (PBS + $10 \mu\text{M}$ CaCl_2 + 50mM MgCl_2) et les chambres de la lame ont été remplies avec du DMEM sans sérum sans antibiotique. Les cellules ont ensuite été infectées avec une culture des bactéries C600 pAg pRFP, pTRC99a pRFP ou pTibCA pRFP (multiplicité d'infection de 30, 10^6 bactéries / puits). Après lavage extensif au PBS-CM pour enlever les bactéries non adhérentes, les puits ont été fixés au paraformaldéhyde 4% 15min à température pièce. Les puits ont été bloqués par PBS + BSA 1% pendant 1h à température pièce. L'immunomarquage de l'ApoAI s'est effectué en utilisant l'anticorps de souris contre l'ApoAI humaine (Abcam). Après lavages au PBS-CM, les noyaux des cellules ont été marqués avec une solution de $0,5 \mu\text{g/mL}$ 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI, Sigma), 1 min, suivi d'un lavage extensif au PBS. Les lames ont ensuite été montées en solution 90% glycérol + 10% TBS + 2mM 1,4-diazabicyclo(2,2,2)octane (DABCO, Sigma) et une lamelle a été scellée avec du vernis sur l'échantillon. La prise des images s'est faite avec un microscope confocal Olympus IX81

FV1000 et l'analyse de la colocalisation avec le logiciel Olympus Fluoview version 3.0a. L'index de colocalisation provient de 15 images par conditions, sur 3 essais.

Adhésion cellulaire. La journée avant l'essai, 5×10^5 cellules HEP-2 ont été ajoutées à des puits de plaque 24 puits CellBIND® (Corning) en DMEM + sérum bovin sans antibiotiques et incubé toute la nuit à 37°C 5% CO₂. Le jour de l'essai, les cellules ont été lavées au PBS et 1 mL de DMEM a été ajouté aux puits. Les essais de compétition avec les anticorps se sont déroulés sous deux conditions d'infection différentes. Dans la première, des anticorps monoclonaux et polyclonaux contre l'ApoAI (1:100, 1:500, 1:1000) et/ou contre l'apolipoprotéine B (1:500) ont été préincubés dans le milieu cellulaire, 1h à 37°C 5% CO₂. Un inoculum de 10⁶ bactéries C600 pAg représentant une multiplicité d'infection de 10 provenant d'une culture fraîche ont été ajoutées aux puits en duplicata, 3h à 37°C 5% CO₂. Le témoin positif d'inhibition d'adhésion utilisé a été une préincubation de 1h température pièce des mêmes bactéries en présence d'anti-AIDA-I 1:100, suivi d'un second ajout dans les puits correspondant lors de l'infection. Après 3 lavages au PBS des bactéries non adhérentes, les cellules ont été lysées par l'ajout de 100 µL Triton X-100 1% 10 min à température pièce et 900 µL de LB a été ajoutée comme diluant. Des dilutions sériées ont été faites sur des géloses pour calculer le nombre de bactéries adhérentes. Le pourcentage d'adhésion cellulaire bactérienne est obtenu grâce à un inoculum de 10⁶ bactéries dans un puits vide dans 1 mL de DMEM soumis aux mêmes conditions d'incubation lors de l'infection et est calculé ainsi : % d'adhésion = (adhérentes / inoculum) x 100.

La deuxième condition d'infection a été effectuée de la même manière mais a été synchronisée par une centrifugation des plaques à 100g pendant 3 min lors de l'ajout des bactéries. L'infection s'est déroulée durant 45 min au lieu de 3h et le témoin négatif employé a été fait avec le vecteur vide C600 pTRC99a, non adhérent.

Pour les cellules Caco-2 polarisées et Hep G2, 24 h avant l'infection, du fénofibrate ou GW7647 (Sigma) solubilisés en DMSO ont été ajoutés aux puits dans leur milieu de culture avec sérum, à 25 µM et 100 nM respectivement. Lors de l'infection, les puits ont été lavés et l'infection s'est déroulée en milieu complet sans antibiotique avec ajout de GW7647 ou de

fénofibrate. Le contrôle négatif employé a été C600 pTRC99a. Les taux d'adhésion ont été rapportés par rapport aux témoins non traités.

RÉSULTATS

AIDA-I interagit avec l'apolipoprotéine A-I purifiée. Afin d'étudier l'interaction entre l'ApoAI et AIDA-I, nous avons voulu caractériser cette interaction entre les protéines purifiées. Pour ce faire, nous avons ajouté de l'ApoAI humaine purifiée et du sérum porcin bouilli, ce dernier étant une composante avec laquelle AIDA-I s'associe. Par la suite, 150 nM d'AIDA-I purifiée a été ajoutée aux puits pour quantifier l'interaction de cette protéine avec l'ApoAI ou le sérum par ELISA. Une observation réalisée durant l'élaboration des paramètres expérimentaux démontre que l'interaction entre AIDA-I et l'ApoAI humaine ou le sérum porcin était fortement accentuée par la présence de détergents (Figure 1A). Nous avons donc testé l'effet de deux détergents, le Triton X-100 0,1% et le Tween 20 0,05%, ce dernier permettant une interaction plus élevée avec l'ApoAI et le sérum porcin. Il est important de mentionner que les détergents ont été utilisés en-deçà de leur concentration micellaire critique et donc que l'effet observé n'est probablement pas dû à la solubilisation de AIDA-I. Ces résultats suggèrent que AIDA-I et/ou l'ApoAI doivent être dans une conformation spécifique qui dépend de la présence de détergents pour permettre leur interaction.

Pour confirmer l'interaction entre AIDA-I et l'ApoAI humaine, nous avons utilisé un ELISA en compétition. Ici, AIDA-I purifiée, a été préincubée en Tween 20 avec et sans un compétiteur (ApoAI humaine 200 µg/mL ou sérum porcin bouilli) avant d'être ajoutées à la plaque ELISA avec des puits d'ApoAI ou de sérum (Figure 1B). La saturation de l'ApoAI humaine a complètement empêché l'interaction AIDA-I / sérum. À l'opposé, l'incubation du sérum comme compétiteur a également empêché la liaison AIDA-I/ApoAI par rapport aux puits sans compétiteurs. Ces résultats indiquent que AIDA-I interagit avec l'ApoAI humaine purifiée, l'ApoAI porcine contenu dans le sérum porcin et potentiellement avec d'autres composantes non identifiées de ce sérum.

L'ApoAI n'est pas la seule composante à interagir avec AIDA-I. Nous avons ensuite cherché à savoir si d'autres sérums provenant d'autres espèces animales pouvaient interagir avec AIDA-I. En ELISA, nous avons testé les sérum bovin de croissance, sérum de bovin fœtal et sérum de cheval. Tous ces séra montrent une affinité envers AIDA-I (Figure 2), suggérant que AIDA-I peut également interagir avec une/des protéines d'origines bovines, équine et porcine, dont potentiellement l'ApoAI.

Les apolipoprotéines sont des constituants inhérents des lipoprotéines retrouvées dans le sang. Elles sont retrouvées associées ou non aux lipoprotéines et certaines peuvent interagir entre-elles. L'étude précédente de notre laboratoire qui a identifié l'ApoAI comme récepteur putatif de AIDA-I a également identifié l'ApoCIII porcine par fractionnement du sérum porcine, indiquant qu'il serait possible que d'autres apolipoprotéines puissent interagir avec AIDA-I. Nous avons donc testé l'interaction d'AIDA-I avec des apolipoprotéines majeures B, CI-III et E2, une variante naturelle de l'ApoE retrouvée chez l'Homme, par ELISA. La figure 3 montre que AIDA-I peut lier les ApoB et ApoE2 comme l'ApoAI mais n'interagit pas avec les ApoCI-III. Ces résultats suggèrent qu'en plus de s'associer avec l'ApoAI du sérum porcine, et par le fait même, des séra bovin de croissance, bovin fœtal ou de cheval, il est probable que AIDA-I puisse interagir avec les apolipoprotéines B et E de ces séra, puisqu'ils sont des constituants majeurs du sang. Il ne faut toutefois pas perdre de vue qu'il peut y avoir d'autres composantes à lesquelles AIDA-I peut se lier dans ces séra.

TibA, une SAAT, ne s'associe pas avec le sérum porcine et les apolipoprotéines. Les SAATs sont une classe d'autotransporteurs partageant des homologies fonctionnelles, structurales, conformationnelles et de séquences en acides aminées. Les SAATs les plus étudiées sont, en plus d'AIDA-I, TibA et Ag43. Puisque TibA est une protéine également étudiée dans notre laboratoire, nous nous sommes demandés si les homologies entre les SAATs pourraient permettre à TibA de s'associer également aux composantes avec lesquelles AIDA-I interagit. Nous avons donc purifié du TibA et testé son affinité avec un sérum porcine bouilli et les apolipoprotéines A-I, B, CI-III et E2 en ELISA. Dans ce cas, TibA purifié n'interagit pas avec les composantes testées comparativement à AIDA-I où nous retrouvons les interactions notés (Figure 4). Ces résultats suggèrent que TibA et AIDA-I, malgré qu'elles soient des protéines montrant des similarités, n'interagissent pas avec les mêmes protéines d'origine animale.

Les bactéries exprimant AIDA-I interagissent avec l'ApoAI associée à la surface cellulaire. L'ApoAI est une protéine dynamique montrant une liaison réversible aux lipides. Elle est retrouvée sous une forme libre (non associée aux lipides), et sous une forme lipidée comportant des structures et conformations intermédiaires par rapport au niveau de lipidation.

Nous nous sommes posés une question à savoir quelle est la forme de l'ApoAI reconnue par les bactéries exprimant AIDA-I lors d'une infection. Nous proposons deux modèles possibles pouvant expliquer l'interaction des bactéries AIDA-I + avec les cellules via l'ApoAI. Dans le premier modèle, les bactéries se lient à l'ApoAI libre et celle-ci associe les bactéries à la surface cellulaire. Dans le second modèle, l'ApoAI associée à la membrane est directement reconnue par les bactéries exprimant AIDA-I et permet l'adhésion aux cellules.

Afin de tester le premier modèle, il faut d'abord que les bactéries AIDA-I+ puisse s'associer à l'ApoAI libre. Pour tester cette interaction, nous avons incubé une culture normalisée de C600 pAg ou le vecteur vide pTRC99a en présence ou non de 10 μ M ApoAI purifiée avant fixation. Après avoir été lysés par traitement thermique, les échantillons ont été soumis à un SDS-PAGE pour ensuite être immunobuvardés contre l'ApoAI (Figure 5). Le sérum porcin a été utilisé comme contrôle positif de la détection de l'ApoAI. Dans le cas d'une interaction entre les bactéries AIDA-I + et l'ApoAI libre, nous devrions voir une bande caractérisant le complexe, fixé par le formaldéhyde, de AIDA-I/ApoAI à environ 173 kDa (145 kDa pour les domaines translocateur et passager d'AIDA-I et 28 kDa ApoAI). En fait, cette bande n'est pas présente pour les C600 exprimant AIDA-I. Il est intéressant de mentionner qu'une bande est présente à environ 35 kDa lorsque l'ApoAI purifiée est ajoutée, indépendamment de l'expression de AIDA-I, suggérant que l'ApoAI s'associe faiblement avec une protéine exprimée par C600 et non pas avec AIDA-I. Ces résultats indiquent que l'ApoAI libre ne peut s'associer aux bactéries exprimant AIDA-I et contredit le modèle d'adhésion par pont via l'ApoAI libre.

Pour vérifier si l'ApoAI à la surface cellulaire est directement reconnue par les bactéries AIDA+, nous avons vérifié si l'ApoAI colocalise avec les C600 AIDA-I+ et non avec le vecteur vide, sur les cellules épithéliales HEp-2. Puisque AIDA-I purifié a montré une affinité envers le sérum bovin de croissance et le sérum bovin foetal, l'infection cellulaire a été réalisée avec des C600 pRFP avec pTRC99a ou pAg en absence de sérum afin d'éviter une potentielle association des bactéries avec le sérum qui pourrait empêcher leur adhésion aux cellules. Après une infection de 3h, les cellules ont été lavées pour enlever les bactéries non adhérentes et l'ApoAI a été révélée grâce à un anticorps contre l'ApoAI et d'un anticorps

secondaire couplé à la FITC. On constate que les C600 pTRC99a adhèrent très peu aux HEp-2, conformément aux résultats antérieurs, (Figure 6A) et qu'un très faible signal ($2,5 \pm 0,4\%$, figure 6B) de ces bactéries colocalise avec l'ApoAI. En fait, l'ApoAI n'est pas présente à la surface cellulaire, montré par l'absence du signal sur les cellules infectées avec le vecteur vide (Figure 6A). Lorsque les HEp-2 sont infectées avec les C600 pAg, $47,5 \pm 3,8\%$ du signal de AIDA-I colocalise avec l'ApoAI, indiquant que l'ApoAI s'associe avec AIDA-I à la surface cellulaire. Il est probable que le signal de l'ApoAI cellulaire mesurée en présence des C600 pAg peut être provoqué par une réponse de stress cellulaire associée au point d'adhésion de ces bactéries. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé la même infection avec des bactéries exprimant l'adhésine TibA (C600 pTibCA). TibA est un excellent contrôle négatif d'interaction puisque la protéine purifiée n'a montré aucune association avec les ligands de AIDA-I testés, comme préalablement démontré. Sur les HEp-2, les bactéries exprimant TibA ont fortement adhéré et ont donné un signal de colocalisation de $9,5 \pm 1,1\%$ avec l'ApoAI, valeur nettement moins élevée qu'avec les C600 pAg. Alors, l'ApoAI perçue sur les cellules HEp-2 colocalisant avec les bactéries AIDA-I+ ne provient pas d'une réponse de stress cellulaire par l'adhésion des bactéries, mais bel et bien d'une interaction spécifique entre la bactérie et la cellule. Ceci confirme le deuxième modèle d'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I via l'ApoAI, à savoir que ces bactéries vont directement s'associer avec l'ApoAI de la surface cellulaire.

Les anticorps contre l'ApoAI et l'ApoB ne bloquent pas l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I. Puisque l'interaction entre AIDA-I et ApoAI se déroule à la surface cellulaire, cette interaction permet-elle une adhésion des bactéries aux cellules? Afin de répondre à cette question, nous avons tenté de bloquer l'adhésion de 10^6 C600 pAg par une préincubation de 1h des cellules avec des anticorps contre l'ApoAI. Pour maximiser les chances de bloquer l'épitope reconnu par AIDA-I, un cocktail d'anticorps monoclonal et polyclonal contre l'ApoAI complète a été employé. Après 3h d'infection, les cellules ont été lavées, lysées et les bactéries adhérentes comptées par étalement sur géloses. L'utilisation de ces anticorps n'a pas compétitionné avec l'adhésion des bactéries, où le cocktail d'anticorps contre l'ApoAI a été utilisé à des dilutions au 1 :1000, 1 :500 ou 1 :100. En présence ou en

absence d'anticorps contre l'ApoAI les taux d'adhésion avoisinaient 35%, contrairement aux anticorps dirigés contre AIDA-I, contrôle positif d'inhibition de l'adhésion (figure 7A).

Nous avons précédemment montré que AIDA-I purifiée pouvait interagir avec les apolipoprotéines B et E2. Il serait alors possible qu'en plus de l'ApoAI, l'ApoB et l'ApoE2 puissent participer à l'adhésion des bactéries aux cellules. Les mêmes infections ont été répétées en présence d'anticorps polyclonaux contre l'ApoB et avec un mélange du cocktail d'anticorps contre l'ApoAI et l'ApoB. Comme nous le montrons dans la figure 7B, aucune diminution des taux d'adhésion n'a été retrouvée avec ces conditions à comparer au contrôle sans anticorps.

Nous avons également testé le cocktail d'anticorps contre l'ApoAI sur un temps d'infection diminué, puisque nous ne connaissons pas la dynamique de la présence de l'ApoAI à la surface des cellules HEp-2. Pour ce faire, le cocktail d'anti-ApoAI été préincubé avec les cellules et l'infection a été réalisée en synchronisant les bactéries à la surface des HEp-2 par une centrifugation de 3 min à 300g et sur un temps d'infection de 45 min au lieu de 3 h. Les mêmes résultats ont été obtenus, à savoir que les anticorps contre l'ApoAI à 1 :100 et 1 :500 ne bloquent pas l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I (figure 7C) par rapport au contrôle sans anticorps, où les taux d'adhésion avoisinent 32%.

À la lueur de ces expériences, il n'est pas possible de confirmer le rôle de l'ApoAI ou de l'ApoB comme récepteurs cellulaires de AIDA-I. Il est possible que l'ApoAI ne soit pas présente à la surface des cellules avant l'adhésion des bactéries, comme il a été montré par microscopie. D'autre part, il est également possible que l'ApoAI et B ne soient pas les récepteurs cellulaires nécessaires pour déclencher l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I.

La surexpression de l'ApoAI chez les cellules sécrétrices d'ApoAI n'affecte pas l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I. Puisque nous n'avons pas été capables de bloquer l'adhésion des bactéries AIDA+ sur les cellules HEp-2 par anticorps contre les apolipoprotéines, nous avons voulu voir l'effet de l'expression de l'ApoAI sur l'adhésion bactériennes des cellules sécrétrices d'ApoAI : les entérocytes Caco-2 polarisées et les hépatocytes Hep G2. Pour polariser les Caco-2, lorsque les cellules ont atteint la confluence sur des filtres Transwell, le milieu complet des compartiments ont été changés aux 2 jours

pendant 15-21 jours jusqu'à une TER 250 à 300 Ω cm². La stimulation de la sécrétion de l'ApoAI de Caco-2 polarisées et de Hep G2 a été effectuée par l'ajout de fénofibrate ou de GW7647 pendant 24h, deux agonistes de PPAR α , un récepteur nucléaire activant la synthèse de l'ApoAI¹⁹¹. L'infection s'est déroulée de la même manière que précédemment, mise à part qu'elle a été faite en présence de 20% de sérum bovin fœtal pour empêcher la mortalité cellulaire retrouvée durant l'infection bactérienne en présence des activateurs. Aucun effet notable sur l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I n'a été retrouvé lors de la stimulation des Caco-2 avec GW7647 (Figure 8A) mais également avec une stimulation au fénofibrate donnant des taux d'adhésion de 163 \pm 37% pour C600 pAg et 171 \pm 44% avec le vecteur vide. Les mêmes effets de GW7647 et du fénofibrate ont été notés avec les hépatocytes Hep G2 (Figure 8B). Ces résultats indiquent que la stimulation des cellules sécrétrices d'ApoAI au GW7647 ne provoque aucune modification dans l'adhésion des bactéries AIDA-I+. Concernant le fénofibrate, ce traitement augmente fortement l'adhésion non spécifique des bactéries peu importe l'expression ou non de AIDA-I et le type cellulaire. Une augmentation de la synthèse de l'ApoAI doit être confirmée par immunobuvardage au niveau des compartiments cytoplasmique, membranaire et dans le milieu extracellulaire afin de valider l'efficacité de la stimulation de la synthèse d'ApoAI dans les Caco-2 au fénofibrate et GW7647. Dans le cas où l'augmentation de la sécrétion de l'ApoAI a bien eu lieu, ces résultats suggèreraient que l'interaction des bactéries AIDA-I avec l'ApoAI n'intervient pas dans le mécanisme d'adhésion et ne serait donc pas le récepteur cellulaire de AIDA-I. Dans le cas inverse, l'adhésion non spécifique rencontrée avec ces composés indiquerait qu'ils auraient d'autres effets cellulaires ApoAI indépendants sur les Caco-2 polarisées et Hep G2, n'apportant aucune piste additionnelle sur le rôle de l'ApoAI dans l'adhésion des bactéries AIDA-I+.

Mis en contexte avec les précédents résultats sur l'adhésion cellulaire inchangée des bactéries exprimant AIDA-I en présence d'anticorps contre l'ApoAI et de la colocalisation cellulaire bactéries AIDA-I+/ApoAI, nos résultats suggèrent davantage que l'interaction entre l'ApoAI et AIDA-I observée avec les protéines purifiées et à la surface cellulaire des cellules épithéliales HEP-2 n'est pas impliquée dans le processus d'adhésion. Ceci indiquerait que

l'ApoAI n'est pas le récepteur cellulaire de AIDA-I, sans remettre en cause la réalité de l'interaction entre AIDA-I et ApoAI, mais dont le rôle reste donc à définir.

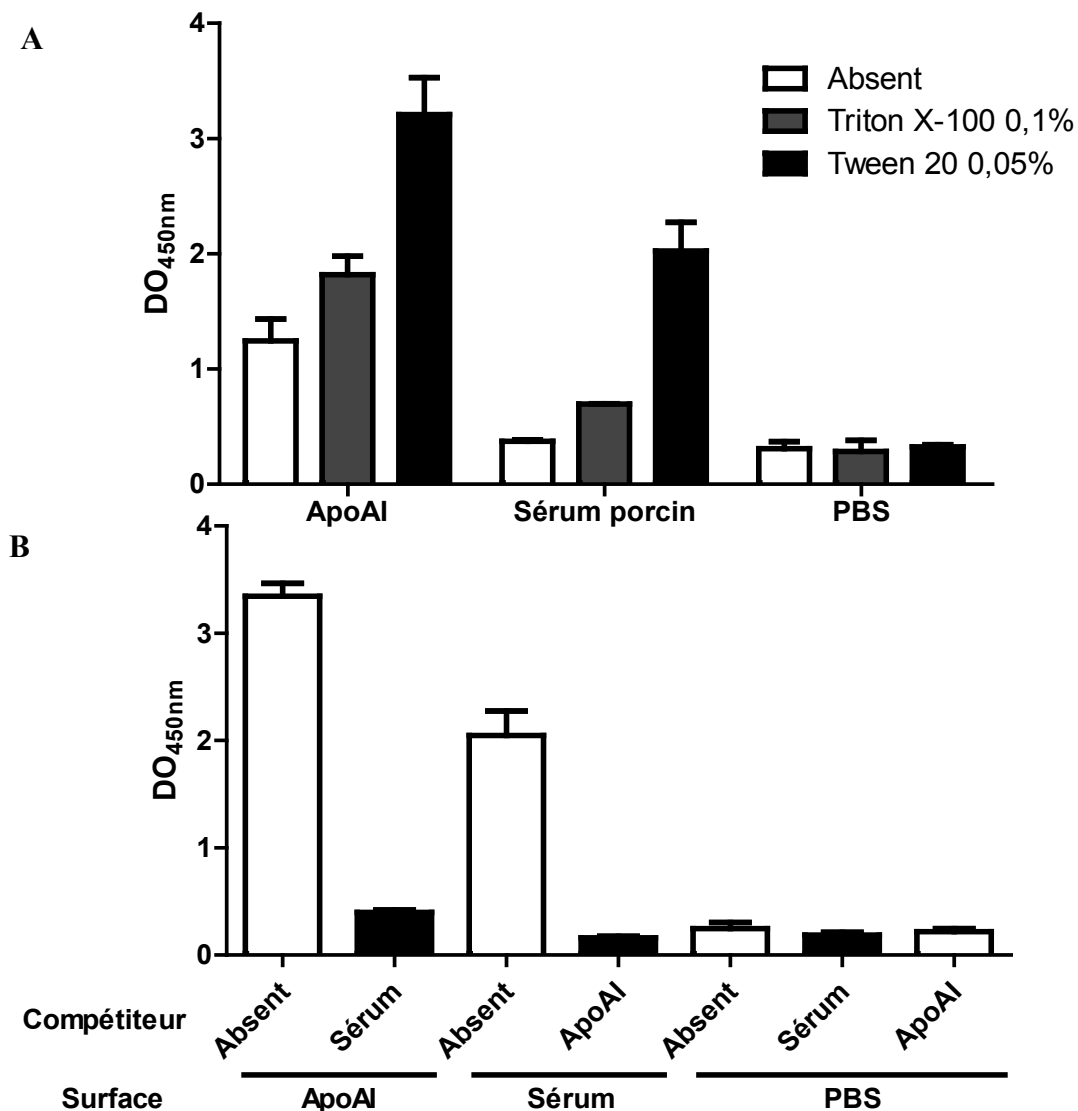


Figure 1 : L'apolipoprotéine A-I purifiée interagit avec AIDA-I purifiée. **A.** Les détergents augmentent l'interaction entre l'ApoAI et AIDA-I purifiée. L'ApoAI humaine ou le sérum porcin bouilli ont été ajoutés aux puits de plaques 96 puits et mis en présence d'une solution de AIDA-I purifiée à 150 nM avec ou sans détergent (Triton X-100 0,1% ou Tween 20 0,05%). **B.** Interaction de AIDA-I avec l'ApoAI en compétition. Les compétiteurs utilisés, ApoAI et le sérum porcin bouilli, ont été incubés en présence de la solution d'AIDA-I avant d'être ajoutée aux puits d'ApoAI ou de sérum porcin bouilli. L'interaction entre ces protéines a été mesurée par ELISA. Les puits de PBS bloqués par la caséine ont été utilisés comme contrôles négatifs du bruit de fond en présence de AIDA-I.

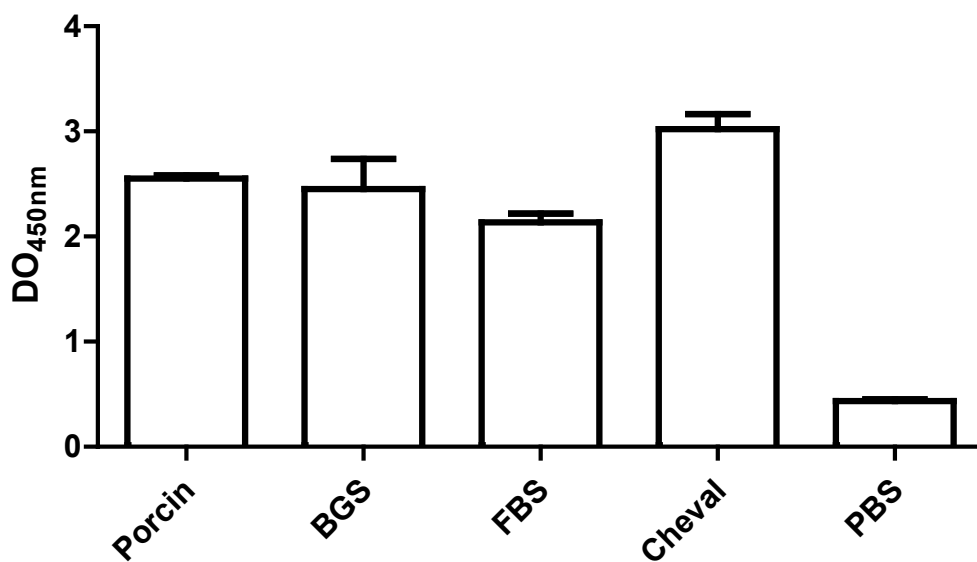


Figure 2 : AIDA-I purifiée interagit avec le sérum de différentes espèces. Les sérums bovin de croissance (BGS), bovin fœtal (FBS) ou de cheval bouillis ont été ajoutés aux puits d'une plaques 96 puits et une solution de 150 nM d'AIDA-I a été ajoutée. L'interaction a été mesurée par ELISA. Les puits contenant du PBS ont servis comme contrôles négatifs de l'interaction avec AIDA-I et le sérum porcin bouilli comme contrôle positif.

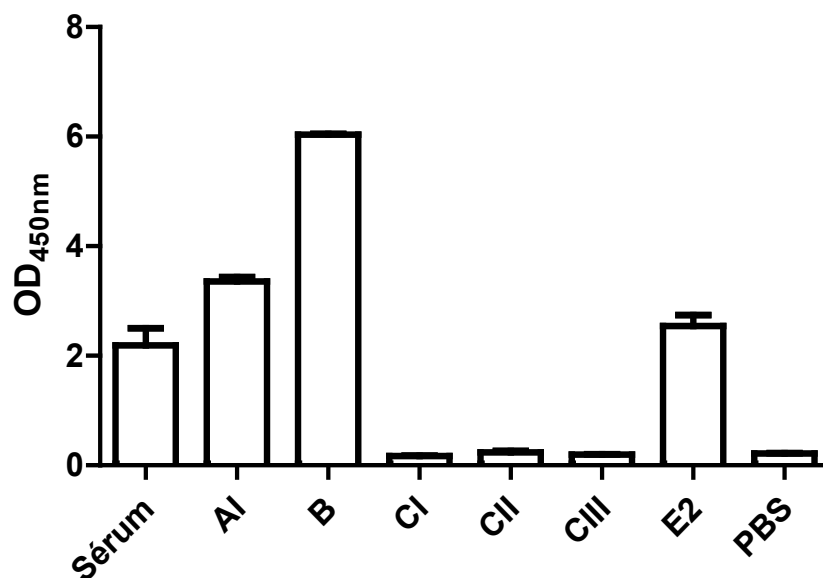


Figure 3 : AIDA-I interagit avec les apolipoprotéines humaines purifiées. Les apolipoprotéines A-I, B, C-I, C-II, C-III et E2 ont été ajoutées au puits de plaques 96 puits et une solution de 150nM d'AIDA-I a été ajoutée. L'interaction a été mesurée par ELISA. Les puits de PBS ont servi de contrôles négatifs de l'interaction avec AIDA-I et le sérum porcin bouilli comme contrôle positif. Apolipoprotéine A-I (AI), apolipoprotéine B, apolipoprotéine C-I-III (CI, CII, CIII) et apolipoprotéine E2 (E2).

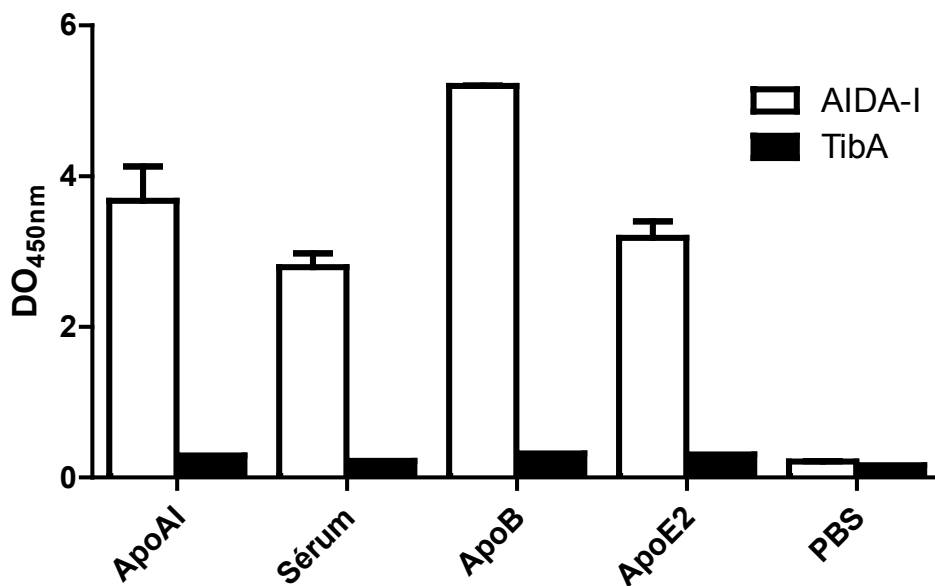


Figure 4 : L'interaction entre AIDA-I purifiée et les composantes testées est spécifique et n'est pas retrouvée avec TibA. Les apolipoprotéines humaines A-I, B, E2 et le sérum porcin bouilli ont été ajoutés aux puits de plaque 96 puits, pour tester leur interaction avec 150 nM de AIDA-I et TibA purifiées, en ELISA. Le PBS a servi de contrôle négatif.

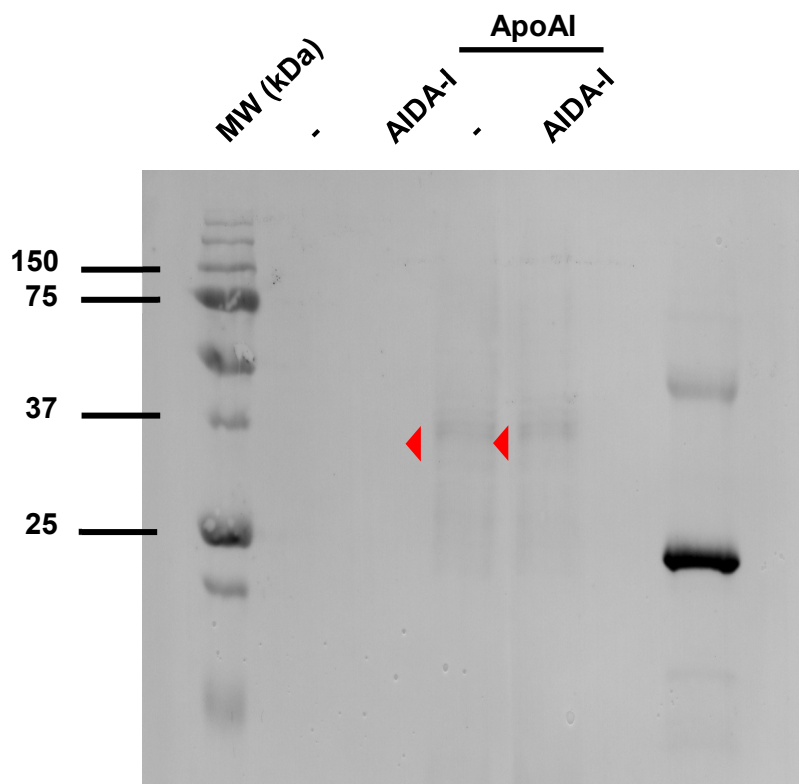


Figure 5 : L'apolipoprotéine A-I dans sa forme libre n'interagit pas avec les bactéries exprimant AIDA-I. Des bactéries C600 comportant le vecteur vide pTRC99a (-) ou exprimant AIDA-I mature par pAg ont été incubées en présence ou non d'ApoAI purifiée humaine avant fixation à la PFA. Après lyse cellulaire et électrophorèse, les bandes d'ApoAI ont été révélés par immunobuvardage à l'aide d'un anticorps contre l'ApoAI humaine. Le sérum porcin bouilli (+) a été utilisé comme contrôle positif de détection de l'ApoAI, révélée par la bande la plus intense à 28 kDa. Les flèches rouges pointent des bandes d'interaction entre C600 et l'ApoAI non spécifique à la présence d'AIDA-I sur les bactéries. MW, marqueurs de poids moléculaires.

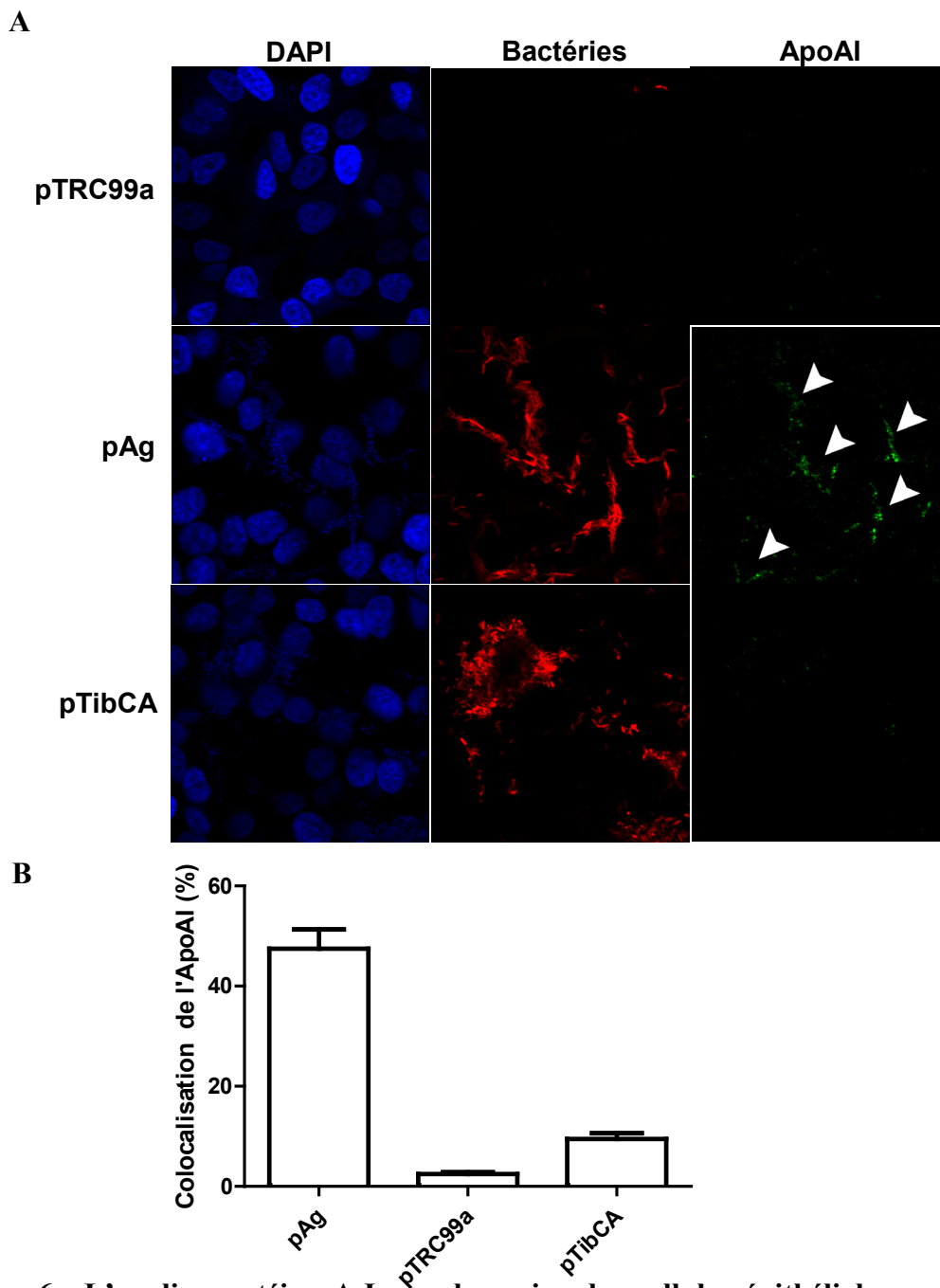


Figure 6 : L'apolipoprotéine A-I membranaire des cellules épithéliales se lie avec les bactéries exprimant AIDA-I. Les cellules HEp-2 en confluence ont été infectées avec des C600 pAg, pTibCA et pTRC99a (contrôle négatif) avec le plasmide pRFP (rouge). Les anticorps contre ApoAI ont été révélés par l'utilisation d'un anticorps secondaire couplé à la FITC (vert) et le noyau des cellules a été marqué au DAPI (bleu). **A.** Images représentatives de la colocalisation de l'ApoAI avec les C600. Les flèches blanches représentent une colocalisation entre le signal vert et le rouge. Les images ont été prises par imagerie confocale, à 40X et **B.** quantification de l'index de colocalisation avec 15 images de 3 infections indépendantes.

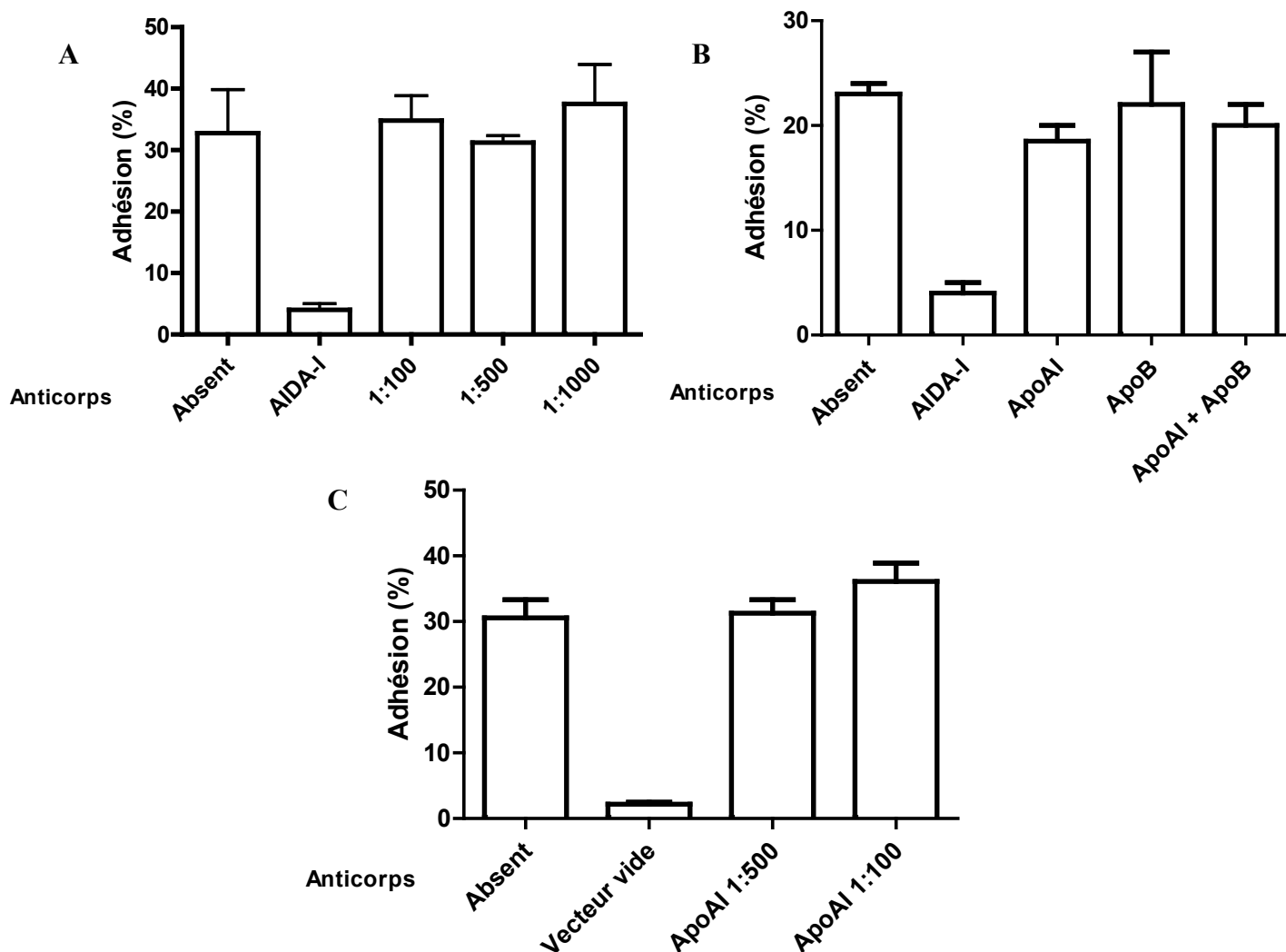
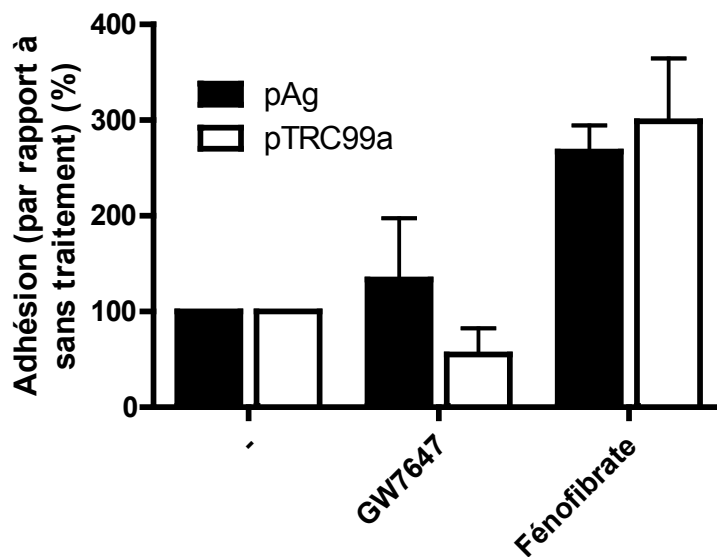


Figure 7 : Compétition par anticorps contre l'ApoAI de l'adhésion cellulaire épithéliale des bactéries exprimant AIDA-I. Les cellules épithéliales HEp-2 ont été infectées 3 h avec des C600 pAg ou pTRC99a en présence A. d'anticorps monoclonaux et polyclonaux (1 :100, 1 :500 et 1 :1000) contre l'ApoAI, B. d'anticorps polyclonaux contre l'apolipoprotéine B et mélange d'anti-ApoAI mono/polyclonaux + anti-ApoB (1 :500) ou C. en synchronisant par brève centrifugation et en diminuant le temps de l'infection (45min). Dans les deux premiers cas, un sérum contre AIDA-I mature avec les C600 pAg a été utilisé comme contrôle négatif d'adhésion et le vecteur vide pTRC99a pour le dernier cas. Après infection, les cellules ont été lavées pour enlever les bactéries non adhérentes, lysées et les bactéries ont été comptées sur gélose, par dilutions sérielles. Les taux d'adhésion ont été calculés par rapport à l'inoculum de départ.

A



B

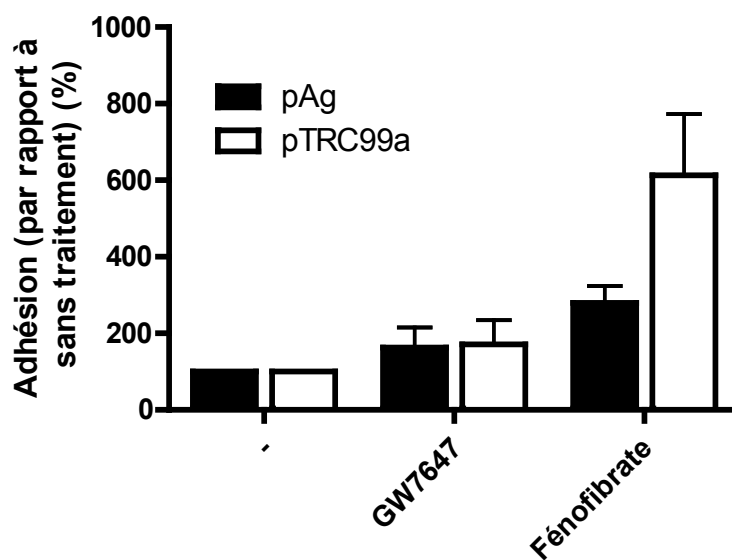


Figure 8 : Effets d'activateurs de la synthèse d'ApoAI sur l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I chez les cellules sécrétrices d'ApoAI en culture. Les cellules, **A.** Caco-2 polarisées ou **B.** Hep G2 ont été stimulées 24 h en présence de 100 nM de GW7647 ou 25 μ M de fénofibrate, ou sans traitement (-), en milieu de culture complet + sérum. Les cellules ont été lavées et infectées avec C600 pAg ou pTRC99a, 3h en milieu complet sans antibiotique, suivi d'un lavage extensif pour enlever les bactéries non adhérentes. Les cellules ont ensuite été lysées et les bactéries comptées sur gélose par dilutions sérielles. Les taux d'adhésion ont été calculés par rapport à l'inoculum de départ et rapportés par rapport aux conditions sans traitement de C600 pAg et pTRC99a.

DISCUSSION

La ED et la PWD sont deux maladies qui ravagent l'industrie porcine mondialement. AIDA-I est une adhésine importante de *E. coli* fréquemment détectée dans les souches causant ces deux maladies. Le récepteur cellulaire permettant l'adhésion des *E. coli* exprimant AIDA-I aux cellules épithéliales et la colonisation des colons de porcelets en phase de sevrage n'a pas encore été identifié, mais une précédente étude de notre laboratoire a isolé l'ApoAI porcine du sérum porcin comme ligand potentiel de AIDA-I (Mélissa René, données non publiées). Puisque l'ApoAI possède des caractéristiques uniques participant au transport du cholestérol chez les mammifères, nous nous sommes intéressés au rôle de l'ApoAI dans l'interaction avec AIDA-I. Pour ce faire nous avons donc étudié l'interaction AIDA-I/ApoAI au niveau des protéines purifiées ainsi que dans le cadre d'infections cellulaires *in vitro*. Nous avons montré que AIDA-I peut se lier à l'ApoAI, B et E2 préférentiellement en présence de détergent et interagit avec des séra porcin, bovin et équin. Nous avons montré que les bactéries AIDA-I+ interagissent avec seulement l'ApoAI associée à la membrane cellulaire mais que des anticorps dirigés contre l'ApoAI n'empêche pas l'adhésion des bactéries sur cellules épithéliales HEP-2. D'autre part, l'activation de la synthèse de l'ApoAI dans des cellules sécrétrices d'ApoAI ne permet pas d'augmenter l'adhésion des bactéries, suggérant davantage que l'interaction entre l'adhésine AIDA-I et ApoAI n'est pas liée au mécanisme d'adhésion.

Il faut premièrement mentionner que la protéine AIDA-I utilisée dans cette présente étude provient du gène *aida* isolé de la souche de *E. coli* 2787 d'un cas de diarrhée infantile humaine. Donc, dans quelle mesure est-ce que l'ApoAI porcine isolée du sérum porcin, de la précédente étude de notre laboratoire, peut-elle interagir avec AIDA-I provenant d'une souche porcine, non testée dans notre étude? Une étude menée par Zhao et collaborateurs en 2009 a séquencé deux allèles de AIDA-I, isolées des souches E58 et E393 à partir de cas cliniques de ED et de PWD dans l'est de Chine⁵². La similarité des nucléotides entre E58 et E393 est de 99,8%, suggérant que AIDA-I est très conservée entre les souches porcines, tandis qu'une homologie de 99,5% a été notée entre la souche humaine 2787 et les deux souches porcines. Les allèles de AIDA-I porcines et humaines sont alors fortement similaires. Une récente étude de notre laboratoire a analysé 24 séquences de *aida* provenant de souches de *E. coli* cliniques et conclu que les allèles sont très conservés⁶⁰. Les variations observées entre les divers allèles porcins et humains n'affectent pas les fonctions d'adhésion cellulaire sur cellules HEP-2,

d'autoagrégation et de formation de biofilm étudiées de AIDA-I. En ce sens, toutes les *E. coli* C600 exprimant AIDA-I originant de ces souches, humaines ou porcines, ont montré des niveaux identiques pour ces fonctions. D'autre part, la comparaison des séquences humaines et porcines a montré que les domaines fonctionnels reliés à l'adhésion étaient très fortement conservés puisqu'on y retrouve les plus faibles taux de variations nucléotidiques. Ces observations suggèrent donc que l'utilisation de AIDA-I provenant d'une souche humaine peut être valide pour étudier son interaction avec les protéines de l'hôte porcin. Qu'en est-il de l'utilisation des apolipoprotéines humaines? L'ApoAI, tout comme AIDA-I, possède des régions de variabilité plus ou moins élevée tout au long de la protéine. Dans ce sens, les hélices- α amphipatiques de l'ApoAI, situées dans l'amas d'hélices de la protéine, sont très bien conservées¹⁹². C'est dans cet amas que se retrouvent les domaines fonctionnels de l'ApoAI lorsque la protéine s'associe aux lipides. Une conservation des résidus dans le domaine C-terminal liant les lipides et permettant la formation de la double ceinture dans les pré β -HDL est également observée¹⁹². Cette conservation est retenue entre les membres d'une même classe¹⁹². Donc, l'ApoAI humaine s'apparente très fortement à l'ApoAI porcine. La forte conservation de AIDA-I et de l'ApoAI nous suggère que les résultats de l'interaction entre AIDA-I humaine purifiée, les composés humains testés et le système de cellules humaines utilisé seraient similaires chez le porc. Par l'ELISA de compétition que nous avons effectuée, nous avons montré que AIDA-I s'associe à l'ApoAI humaine, mais que cette association peut être complètement bloquée par l'ajout de sérum porcin. Puisque l'ApoAI porcine avait précédemment été isolée par chromatographie d'affinité du sérum porcin, ceci indique que le domaine d'interaction de l'ApoAI (et potentiellement des ApoB et E2) avec AIDA-I est retrouvé chez les hommes, les porcs et probablement chez les chevaux et les bovins, résultats obtenus par l'interaction d'AIDA-I avec ces séras mais aussi avec d'autres mammifères.

Chez les bovins, chevaux, moutons et lapins, le gène de AIDA-I, chez les *E. coli* causant des diarrhées chez ces espèces, n'a pas encore été détecté⁵³. Dans notre étude, nous avons montré que AIDA-I peut s'associer au sérum porcin autant qu'avec les sérums d'origines bovine, bovine fœtale et équine. Puisque AIDA-I ne semble pas être prévalent chez les animaux autres que les porcs, ces résultats nous ont surpris puisque nous nous attendions à ne pas retrouver

d'interaction avec AIDA-I et les autres espèces animales. Toutefois, un petit échantillon de souches cliniques a été testé chez ces animaux et donc un plus grand nombre d'échantillons doivent être testés afin de tirer une conclusion plus définitive. Quel pourrait être le/les rôles de l'interaction avec les apolipoprotéines autre que dans l'adhésion cellulaire durant l'infection de ces hôtes?

Les mécanismes antibactériens de l'ApoAI sont bien connus. Chez les poissons, l'ApoAI purifiée a démontré une activité bactériolytique *in vitro* directe contre des Gram + et des Gram - dont *Escherichia coli*, *Yersinia ruckeri*, *Pseudomonas* sp, *Planococcus citreus*, *Streptococcus* sp et *Mycobacterium marinum*¹⁹³. Le sérum humain montre également une activité similaire via l'ApoAI et les HDL chez *Yersinia enterocolitica*, seulement lorsque l'antigène O des LPS est présent⁹⁴. L'ApoAI est un constituant de l'immunité passive anti-inflammatoire de l'hôte par sa forte affinité aux LPS, neutralisant les endotoxines, et probablement d'autres constituants microbiens. En ce sens, la présence de l'ApoAI libre ou associée aux HDL diminue significativement la mortalité cellulaire induite par la présence de LPS purifié chez les macrophages, mais également chez la souris dans le cadre de chocs septiques¹⁹⁴. Corroborant ce rôle antimicrobien, nos résultats d'immunobuvardage de l'ApoAI libre sur les C600 exprimant AIDA-I ou non montrent que l'ApoAI libre reconnaît faiblement une cible *E. coli* C600 spécifique indépendamment de l'expression de AIDA-I. L'observation d'une colocalisation entre l'ApoAI cellulaire et les C600 AIDA-I+ nous a poussé à utiliser une *E. coli* adhérente n'exprimant pas AIDA-I afin de savoir si le signal d'ApoAI perçue avec cette dernière n'aurait pas pu être une réponse cellulaire antimicrobienne contre les LPS de *E. coli* C600. L'absence du signal de l'ApoAI cellulaire avec des *E. coli* C600 adhérents exprimant l'adhésine TibA nous a permis de conclure que l'interaction entre AIDA-I et ApoAI à la surface cellulaire provient bel et bien d'une interaction spécifique entre les deux protéines et non d'une réponse antimicrobienne de l'ApoAI contre les *E. coli* C600.

Les trois SAAT classiques, c'est-à-dire AIDA-I, TibA et Ag43, étaient précédemment considérées similaires par leurs fonctions et leur structure de répétitions d'un motif de 19 acides aminés. Une vague d'études récentes sur ces SAAT montre davantage que ces protéines sont très différentes. D'une part, TibA possède un domaine riche en proline essentiel pour sa fonction d'adhésion⁸¹. Ce domaine est absent chez AIDA-I et Ag43. Lors de la biogénèse

d'AIDA-I et de Ag43, ces adhésines à la surface subissent un clivage autocatalytique, mécanisme absent chez TibA⁷⁷. De plus, Ag43 montre une affinité envers la matrice extracellulaire dont le collagène et la laminine. L'interaction avec les protéines de la matrice n'a pas été notée avec AIDA-I dans l'étude précédente de notre laboratoire (données non publiées). En lien avec les différences entre les SAAT, nos résultats suggèrent que l'interaction de AIDA-I avec les ApoA1, B et E2, absente chez TibA, semble être exclusive à AIDA-I. TibA, retrouvée chez la souche humaine *E. coli* H10407¹⁹⁵, n'a pas encore été détectée chez des souches porcines, impliquant que son ligand n'est probablement pas présent chez cette espèce, contrairement à AIDA-I. Somme toute, les SAAT sont véritablement des protéines différentes. Ceci nous indique que TibA est bon un contrôle négatif de l'interaction AIDA-I / apolipoprotéines au niveau des protéines purifiées et en infection cellulaire.

Notre étude a montré que l'association entre AIDA-I et les apolipoprotéines purifiées est dépendante de la présence de détergents. Nous savons que la conformation de AIDA-I est sensible aux détergents, qui pourrait impliquer une conformation spécifique nécessaire pour que AIDA-I s'associe avec l'ApoAI. Lorsque des billes recouvertes d'AIDA-I, agrégées, sont en présence de bile, de sels ou d'autres types de détergents, il y a dissociation complète des agrégats¹⁹⁶. (Victoria Girard, données non publiées). La bile et les sels étant présents dans la lumière intestinale, une hypothèse de notre laboratoire expliquant le changement de conformation d'AIDA-I en infection *in vivo* implique la transition de sa phase agrégative à adhésive des bactéries exprimant AIDA-I lorsqu'elles se retrouvent dans l'intestin de l'hôte. Cette transition serait modulée par la présence de bile et de sels de l'intestin de l'hôte. Suivant cette hypothèse, il serait possible que la formation du complexe AIDA-I / ApoAI, dans le cadre de l'infection porcine, se réalise seulement lorsque AIDA-I n'est pas associée avec d'autres molécules d'AIDA-I. Cette condition serait obtenue dans l'intestin des porcelets par la bile et les sels et permettrait la transition d'AIDA-I, à la surface des *E. coli*, d'une conformation autoaggrégative à une conformation favorisant l'interaction avec l'ApoAI pour adhérer aux entérocytes.

Connaissant les différentes conformations de l'ApoAI, de forme libre ou par les différents niveaux de lipidation, la présence de détergents affecte grandement sa conformation. Des études sur la structure de l'ApoAI utilisent les détergents comme agents mimant l'association

de l'ApoAI aux lipides¹⁹⁷. Puisque nos résultats indiquent que l'ApoAI libre n'interagit pas avec les bactéries AIDA-I+ mais que l'interaction se déroule lorsque l'ApoAI est associée à la surface des cellules (forme liée aux lipides membranaires), il pourrait être possible de retrouver une interaction avec les HDL. Il est intéressant de noter que l'effet des détergents est similaire chez l'ApoB¹⁹⁸ et l'ApoE¹⁹⁹, indiquant qu'il est également possible de retrouver une interaction AIDA-I / apolipoprotéines au niveau des LDL, VLDL et CM. Ces apolipoprotéines en présence de détergent ont montré une interaction avec AIDA-I purifiée, dans notre étude. Suite à la chromatographie d'affinité sur colonne d'AIDA-I qui a permis d'identifier l'ApoAI du sérum, une très grande quantité de lipides a été isolée (Mélissa René, données non publiées), suggérant l'association de l'ApoAI aux lipoprotéines. L'isolement fréquent dans cette même étude de l'ApoCIII en chromatographie, une apolipoprotéine associée aux HDL²⁰⁰, et le fait que l'ApoCIII n'interagit pas avec AIDA-I selon nos résultats, corroborent l'hypothèse d'une interaction avec les lipoprotéines. Dans ce cas, l'interaction entre l'ApoAI associée aux HDL et AIDA-I, aurait permis la coprécipitation de l'ApoCIII. Afin de tester cette hypothèse, un test ELISA pourrait être effectué sur des bactéries AIDA-I+ en présence d'une solution de HDL, LDL, VLDL ou CM purifiées. Étonnamment, ces lipoprotéines ne sont pas retrouvées au niveau du lumen intestinal mais dans la circulation sanguine. Donc, l'interaction entre AIDA-I et les lipoprotéines doit probablement se réaliser au niveau du sang ou d'un autre organe. Quel pourrait être le rôle de l'interaction AIDA-I / lipoprotéines dans la circulation sanguine? Il est difficile de répondre à cette question, puisqu'aucune étude n'a testé la prévalence de AIDA-I dans des souches de *E. coli* extraintestinales et donc, nous ne pouvons rien conclure sur l'importance de l'interaction AIDA-I / lipoprotéines, si bien sûr, elle possède un rôle dans la pathogénèse des *E. coli* exprimant AIDA-I

Promotion de l'infection des microorganismes par les apolipoprotéines

Quelques interactions favorables à l'infection de l'hôte entre des microorganismes et les apolipoprotéines sont connues. Les *Mycoplasma* sont des procaryotes ayant une activité biosynthétique très limitée et doivent parasiter l'hôte afin d'obtenir les nutriments nécessaires à leur réplication et à leur survie²⁰¹. Cette bactérie n'a pas de paroi et maintient sa stabilité structurale en transférant le cholestérol associé aux HDL et au LDL vers sa membrane

cellulaire²⁰¹. Une simple incubation des *Mycoplasma* en présence de HDL et LDL dérivés de sérums d'animaux permet leur croissance²⁰². Cultivées en sérum, les *Mycoplasma* ont montré une capacité élevée d'absorption de phospholipides et de cholestérol libre ou estérifié via l'action de récepteurs bactériens protéases sensibles²⁰³. Ces observations suggèrent donc que les *Mycoplasma* peuvent se lier aux lipoprotéines afin d'y extraire les composants nécessaires à leur survie. Quoique l'identité du/des récepteurs participant à cette fonction était alors inconnue, ces rôles ont été associées plus tard à Mlp, une famille de lipoprotéines mycoplasmiques²⁰¹. L'incubation des lipoprotéines de *Mycoplasma. arthritidis* en sérum, en présence de macrophages, a permis de découvrir une lipoprotéine bioactive induisant l'activation des macrophages et la sécrétion de TNF- α / IL-6²⁰¹. Cette activation n'était pas retrouvée lorsque les lipoprotéines mycoplasmiques provenaient d'une incubation en absence de sérum. La protéine bioactive était en fait l'ApoAI du sérum. Cette étude a également montré que l'ApoAI du sérum s'associe à une lipoprotéine Mlp de 41 kDa chez *M. arthritidis*. Étonnamment, comme mentionné, l'ApoAI possède une activité anti-inflammatoire contre les LPS bactériens, mais dans le cas de l'association avec les lipoprotéines mycoplasmiques, l'ApoAI est spécifiquement activée et permet une forte réponse inflammatoire CD14 et TLR2 macrophage-dépendante, retrouvée en infection de souris et chez les macrophages *in vitro*. Cette puissante inflammation, contraire aux rôles connus de l'ApoAI, est caractéristique des infections à *Mycoplasma*.

Les infections à *Chlamydia trachomatis* et *C. pneumoniae* sont dites athérogéniques, c'est-à-dire qu'elles promeuvent la formation de plaques athérosclérotiques rencontrées lors d'un apport riche en cholestérol, suggérant que ces bactéries interviennent dans le transport du cholestérol. Il a été montré que la formation des «foam cells» par *C. pneumoniae* est accélérée lorsque les macrophages sont prétraités avec les LDL. D'autre part, l'infection des hépatocytes est complètement abolie par la stimulation du transport inverse du cholestérol via le fénofibrate²⁰⁴, un activateur de la synthèse de l'ApoAI. Ceci implique un rôle directe des LDL dans l'infection des *Chlamydia*. En fait, l'étude conduite par Bashmakov en 2010 a montré que ces deux *Chlamydia* s'associent directement aux LDL du sérum humain via l'ApoB, mais pas avec les HDL²⁰⁵. Lorsque les corps élémentaires des bactéries sont préincubés avec les lipoprotéines natives contenant l'ApoB, l'infection des hépatocytes Hep G2 est fortement

augmentée, malgré que les bactéries en absence de LDL ont également produit une infection. D'autre part, des anticorps dirigés contre les LPS de *C. trachomatis* et *pneumoniae* reconnaissent également, un épitope de l'ApoB par mimétisme moléculaire²⁰⁶. Durant l'infection par ces bactéries, il y a induction de la formation de LDL oxydés²⁰⁷ et présence d'anticorps dirigés contre l'ApoB de ces LDL. Il est intéressant d'ajouter que l'association entre les anticorps contre l'ApoB et les LDL oxydés induit une plus grande absorption des LDL oxydés par les macrophages²⁰⁸. Mis en contexte, ces observations suggèrent que les *Chlamydia* utilisent un mimétisme moléculaire de l'ApoB et s'associent avec les LDL via l'ApoB afin d'augmenter l'efficacité d'infection des macrophages dans des conditions d'athérosclérose et d'hyperlipidémie. On retrouve même une liaison des corps élémentaires avec l'ApoE4 augmentant leur attachement aux cellules exprimant cette apolipoprotéine²⁰⁹. Tout récemment, il a été démontré que les corps d'inclusion de *C. trachomatis* dans les cellules infectées avec CLA-1 (un homologue de SR-B1), se retrouvent avec l'ApoAI et ABCA1 au niveau des vésicules contenant les corps²¹⁰. Il y a également accumulation de phosphatidylcholine dans ces vésicules. Ces marqueurs indiquent que la bactérie utilise la machinerie de biogénèse des HDL à l'intérieur des cellules. En traitant les cellules au glyburide, une drogue inhibant l'efflux de cholestérol par SR-B1 et ABCA1, ou en inactivant ABCA1, la croissance intracellulaire de *C. trachomatis* a été réduite tout comme l'apport de phosphatidylcholine dans les vésicules. Ici, *C. trachomatis* peut cibler les mécanismes de biogénèse des HDL de l'hôte afin de permettre sa croissance en déviant les lipides et le cholestérol cellulaires vers les corps d'inclusion.

L'interaction entre les lipoprotéines et certains streptocoques du groupe A semble également participer à la pathogénèse de ceux-ci. Une large proportion de ces streptocoques expriment une protéine appelée SOF (Serum opacity factor)²¹¹. Lorsque cette protéine est incubée en présence de sérum, ce dernier s'opacifie. Le substrat a été identifié comme étant les HDL et non les VLDL et LDL²¹². L'incubation de SOF en présence de HDL altère profondément la structure de cette protéine. La liaison de haute affinité entre les deux protéines provoque la formation d'une petite particule de préβ-HDL riche en phospholipides et d'une particule de microémulsion riche en CE²¹². Cette dernière fusionne avec d'autres microémulsions afin de produire une énorme vésicule de CE. La déstabilisation des HDL provoque le relâchement

rapide de l'ApoAI sans la détruire²¹². Étonnamment, l'opacification du sérum par SOF augmente l'efflux du cholestérol du transport inverse du cholestérol, anti-athérogénique²¹³. Le rôle de cette protéine n'est pas encore bien défini, mais il a été démontré que l'accumulation des préβ-HDL par SOF diminue la sécrétion de TNF-α et d'IL-6 chez les macrophages, des cytokines inflammatoires et donc aurait activité anti-inflammatoire²¹³. L'adhésine Scl1, une protéine collagen-like de *Streptococcus pyogenes*, se lie directement à l'ApoAI associée aux HDL, mais également à l'ApoB des LDL, sans toutefois s'y associer lorsque retrouvée dans leurs formes non lipidées^{214,215}. En fait, ces lipoprotéines se retrouvent à la surface des streptocoques Scl1+ exclusivement. Toutefois, l'importance de cette interaction n'a pas été définie.

Le dernier type d'interaction apolipoprotéines – bactéries connu est par rapport à l'activité protéolytique de certaines protéines procaryotiques. Chez *Porphyromonas gingivalis*, une bactérie pro-athérogénique, l'ApoB associée aux LDL est clivée et permet l'agrégation des LDL. Les LDL déstabilisés sont par la suite éliminés par les macrophages et promeut leur différenciation en « foam cells »²¹⁶. D'autre part, EspP et EspI, des autotransporteurs sérine protéases chez *E. coli*, clivent l'ApoAI non lipidée *in vitro*²¹⁷.

Rôles de l'interaction ApoAI / AIDA-I chez E. coli

Les résultats de notre étude ne permettent pas de déduire un rôle potentiel de l'interaction AIDA-I / ApoAI puisque l'ApoAI n'intervient pas dans l'adhésion cellules des bactéries exprimant AIDA-I. Connaissant les rôles antimicrobiens de l'ApoAI, il pourrait être possible que cette interaction empêche la liaison de l'ApoAI aux LPS (ou autres molécules) de *E. coli*. L'interaction pourrait participer à l'inhibition d'une réponse antimicrobienne, telle qu'observée chez les streptocoques du groupe A et chez les *Mycoplasma*, lorsque les bactéries AIDA-I+ infectent les intestins des porcelets. D'autre part, il se pourrait que le rôle de l'adhésine Scl1 chez les *Streptococcus* du groupe A soit similaire à AIDA-I concernant l'interaction aux apolipoprotéines : AIDA-I et Scl1 se lient spécifiquement aux ApoAI et ApoB, et cette liaison s'effectue seulement en présence de détergent ou lorsqu'associées aux lipoprotéines. Malgré tout, le rôle de Scl1 dans la pathogénèse microbienne des *Streptococcus* via l'ApoAI ou les HDL n'est pas connu et ces études n'ont pu démontré que cette interaction

est nécessaire à l'adhésion des bactéries sur les cellules cibles. Finalement, il est très intéressant de mentionner que l'adhésine pH6 antigène de *Yersinia pestis* peut lier directement l'ApoB associée aux LDL humains²¹⁸. Les anticorps contre ApoB ne bloquent pas cette interaction. L'adhésine pH6 antigène associé à ces lipoprotéines possède une activité d'adhésion moins élevée chez les macrophages indépendamment de la présence des LDL-R liant les LDL. Dans ce cas, le rôle de l'association bactérie – LDL semble intervenir dans le milieu extracellulaire. Les interactions entre les bactéries et les apolipoprotéines via leurs adhésines sont documentées mais les rôles de ces interactions, par exemple dans l'adhésion cellulaire, ne sont pas encore définis. Afin d'éliminer définitivement l'hypothèse de l'ApoAI comme récepteur cellulaire de AIDA-I, nous devons réaliser des infections sur des cellules où l'ApoAI a été inactivée.

Un rôle possible de l'interaction entre AIDA-I et apolipoprotéines lors de l'infection serait l'invasion cellulaire. Une précédente étude de notre laboratoire a montré que des mutations inactivant la fonction d'adhésion de AIDA-I n'empêchait pas l'invasion cellulaires des bactéries⁸⁰. Cette observation suggère que l'invasion et l'adhésion sont des fonctions découplées et peuvent être dues à des interactions protéiques différentes. De ce fait, si l'ApoAI, ou l'ApoB et E2, n'interviennent pas au niveau de l'adhésion, une possibilité pourrait être qu'elles participent à l'invasion cellulaire des *E. coli* AIDA-I+ par l'endocytose des apolipoprotéines, un phénomène bien documenté pour les apolipoprotéines¹⁵⁷.

Tout comme pour *C. trachomatis*, il serait possible que la machinerie de biogénèse des HDL puisse cibler les bactéries exprimant AIDA-I afin d'expliquer l'ApoAI à la surface cellulaire. Puisque ABCA1 intervient dans la première étape de lipidation de l'ApoAI libre en générant un microdomaine membranaire apte à stabiliser l'ApoAI libre, ABCA1 pourrait participer à l'interaction entre l'ApoAI membranaire et les bactéries exprimant AIDA-I. Un problème de l'utilisation de la lignée cellulaire HEp-2 est qu'elle ne permet pas la sécrétion des apolipoprotéines dans le milieu et n'exprime pas ABCA1. Les lignées épithéliales, dont HeLa, ne participent pas à l'efflux du cholestérol sans l'expression d'ABCA1 induite d'un plasmide transfecté et par l'apport externe d'ApoAI²¹⁹. Puisque les chances de localisation d'ABCA1 au point de contact sont donc nulles, il est possible de déduire que ABCA1 ne participe pas à l'interaction AIDA-I / ApoAI au niveau de la cellule. Le signal d'ApoAI que nous observons

est donc produit par un mécanisme ABCA1-indépendant chez les HEP-2. Qu'en est-il d'une possible utilisation de SR-B1 ou ABCG1 qui pourrait être similaire à *C. trachomatis*? Il aurait été peu probable de retrouver cette protéine au point d'adhésion des bactéries AIDA-I+, car les infections se sont déroulées en absence de sérum. Or, SR-B1 et ABCG1 permet le transfert de cholestérol libre, triglycérides et phospholipides vers les plus petit HDL via l'ApoAI lipidée. L'absence du sérum implique que les HDL ne sont pas présents durant l'infection, tout comme l'ApoAI dans le milieu extracellulaire. Il est également peu probable que ces composantes de la machinerie de biogénèse des HDL soient exprimées sur des cellules épithéliales comme HEP-2. Il faut ajouter que les images d'immunofluorescence par microscopie confocale montrent que l'ApoAI n'est pas présente à la surface cellulaire des HEP-2 avant l'infection, impliquant qu'il y a une translocation de l'ApoAI intracellulaire vers la membrane cellulaire, avant d'être stabilisée par l'interaction directe avec AIDA-I à la membrane. Ces observations suggèrent que l'interaction entre l'ApoAI et AIDA-I n'intervient pas dans les mécanismes d'efflux du cholestérol dans les HDL. En fait, des mécanismes d'interaction de l'ApoAI extracellulaire avec les membranes cellulaires sont connus avec ABCA1, SR-B1 et les radeaux lipidiques²²⁰, mais dans le cas de cette étude, cette ApoAI extracellulaire n'est pas présente. Ce fait explique également pourquoi les anticorps contre l'ApoAI n'ont pas permis de bloquer l'adhésion des bactéries AIDA-I+ : il n'y a aucune ApoAI dans le milieu extracellulaire durant l'infection. Quel pourrait-être le rôle de cette interaction? AIDA-I pourrait-elle interagir avec une autre protéine qui permettrait de cibler l'ApoAI intracellulaire au point de contact des bactéries?

Sécrétion de l'ApoAI chez les entérocytes porcins

La sécrétion de l'ApoAI et des autres apolipoprotéines dépend fortement de la présence de lipides diététiques. Il a été montré que la présence des lipides polyinsaturés à longues chaîne dans le milieu de culture des IPEC-1, une lignée d'entérocytes de porcelets, induit une sécrétion de l'ApoAI dans le milieu basolatéral, associée à la fraction des HDL¹⁶², non retrouvée dans le milieu apical. Étonnamment, ces lipides ne modifient pas la synthèse de l'ApoAI, suggérant que la présence de lipides module leur sécrétion. Un effet similaire est retrouvé lorsque des porcelets de deux jours sont nourris avec une diète riche en triglycérides

et en phosphatidylcholine, au niveau du jéjunum¹⁶⁴. Le contenu mucosal du lumen intestinal porcin en ApoA1 et ApoB est appauvri en présence d'une diète riche en triglycérides contrairement à une diète pauvre de triglycérides¹⁶⁵. Lorsque les porcs sont sevrés pendant 24h, environ 35% de la fraction protéique présente dans le lumen intestinal est attribuée aux ApoA1 et B. Chez le rat et le porc, l'ApoA1 et l'ApoB, lorsque sécrétées dans le lumen, sont retrouvées à l'état libre, non associées aux lipides diététiques²²¹. Lors du sevrage, l'ApoA1 est aussi retrouvée au niveau de l'épithélium jéjunal porcin¹⁶³ associée strictement aux vili des entérocytes et sécrétée activement dans le lumen, contrairement à l'ApoB qui est seulement retrouvée dans le lumen intestinal¹⁶⁶. Finalement, une localisation basolatérale des apolipoprotéines A et B liées aux chylomicrons est observée en présence de lipides chez les entérocytes Caco-2 polarisées¹⁶³. Ces observations indiquent que 1) L'absence de lipides diététiques permet la sécrétion au niveau du lumen intestinal des ApoA1 / ApoB libres et à la surface des entérocytes pour l'ApoA1 associée aux membranes, 2) La présence de ces lipides empêche la sécrétion de ces apolipoprotéines au niveau du lumen et à la surface apicale des entérocytes et 3) La présence des lipides permet une sécrétion basolatérale de ApoA1 et ApoB associées aux chylomicrons et aux HDL afin de transporter le cholestérol et les lipides diététiques aux hépatocytes.

Modèle d'infection intestinale des bactéries exprimant AIDA-I dans la ED et PWD

À la lumière des connaissances de la sécrétion de l'ApoA1 dans l'intestin des porcelets, de l'effet du sevrage dans la ED et PWD, ainsi que de l'interaction AIDA-I / ApoA1 confirmée par cette étude, nous proposons un modèle de colonisation des intestins de porcs par les bactéries exprimant AIDA-I. En premier lieu, les porcelets nouveau-nés sont nourris au lait maternel contenant une grande quantité de lipides. Cette diète permet la sécrétion basolatérale de l'ApoA1, où elle sera associée aux chylomicrons et aux HDL afin de transporter le cholestérol dans le corps par le transport inverse du cholestérol. Puisque la sécrétion n'est pas retrouvée dans le lumen intestinal à la surface des entérocytes, les bactéries exprimant AIDA-I ne pourront coloniser les intestins des porcelets affectés et donc, aucune apparition de la ED et PWD (Figure 9A). Lorsqu'il y aura transition de la diète au sevrage des porcelets, la diète plus pauvre en lipides induit la sécrétion dans le lumen de l'ApoA1 libre, mais également associée à

la membrane des entérocytes. Nos résultats suggérant que l'ApoAI libre n'interagit pas avec AIDA-I et que seule l'ApoAI membranaire forme un complexe avec l'adhésine, les bactéries coloniseront la surface des intestins des porcelets et mèneront à l'apparition de la ED et PWD (Figure 9B). Il est intéressant de noter que l'ApoAI retrouvée à la surface des entérocytes est fortement associée aux radeaux lipidiques membranaires et stabilisent sa présence à cette surface¹⁶⁶. Mentionnons que la bile (détergent) présente dans le lumen intestinal peut potentiellement moduler la transition de la forme libre de l'ApoAI à une forme associée aux lipides. Nos résultats présagent que AIDA-I pourrait interagir avec cette dernière conformation. Alors, il serait possible que la sécrétion dans le lumen de l'ApoAI en présence de bile permette la formation du complexe bactérie AIDA-I+ / ApoAI, et que ce dernier puisse se déposer sur la paroi intestinale pour permettre la colonisation des porcelets.

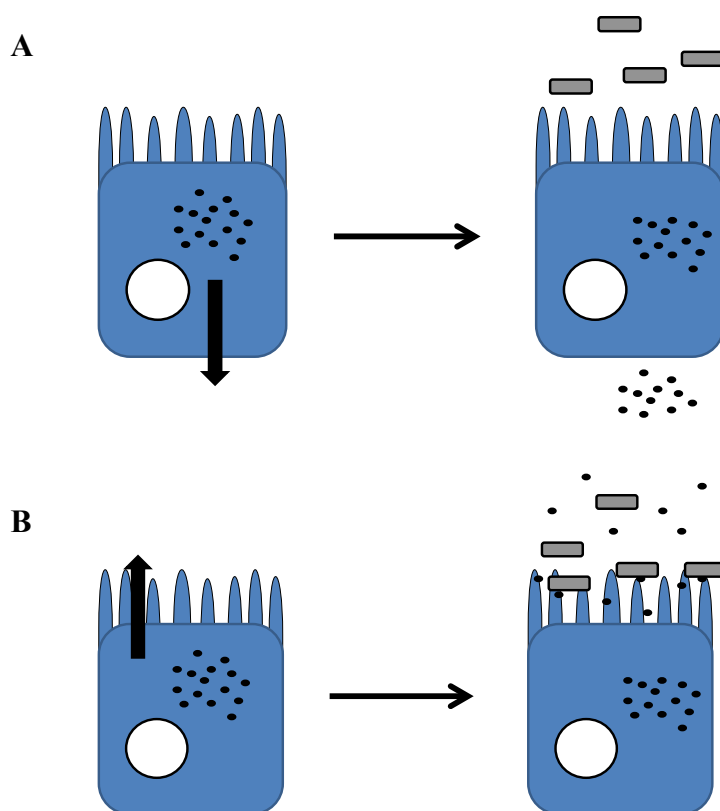


Figure 9 : Modèle d'infection des entérocytes provoquant la ED et PWD chez les porcelets infectés avec des bactéries exprimant AIDA-I. **A.** Le porcelet nouveau-né est nourrit au lait maternel, riche en lipide. L'ApoAI est sécrétée du côté basolatéral de l'entérocyte afin de transporter les lipides diététiques par le RCT. Les bactéries exprimant AIDA-I ne peuvent être en contact avec l'ApoAI et ne pourront coloniser l'intestin. **B.** Le porcelet sevré est nourri avec une diète plus pauvre en lipides, permettant la sécrétion de l'ApoAI dans le lumen intestinal mais également associée à la surface des entérocytes. Les bactéries AIDA-I+ peuvent alors interagir avec l'ApoAI membranaire afin de coloniser l'intestin, provoquant l'apparition de la ED et PWD. L'entérocyte est en bleu, les rectangles gris représentent les bactéries AIDA-I+, les flèches noires indiquent la direction de la sécrétion de l'ApoAI et les points noirs, l'ApoAI.

À partir de ce modèle d'infection des bactéries AIDA+ par l'ApoAI intestinale chez les porcelets sevrés, un traitement relié à la diète pourrait être produit pour prévenir la ED et la PWD. Puisque la sécrétion apicale ou basolatérale de l'ApoAI, ApoB et probablement des autres apolipoprotéines est strictement liée à la diète, il serait possible de stimuler une sécrétion basolatérale des apolipoprotéines afin d'empêcher l'interaction AIDA-I / apolipoprotéines du côté apical des entérocytes durant le sevrage. Pendant la transition au sevrage, du lait maternel à une diète pauvre en lipide, l'addition de lipides à la diète pourrait réaliser cet effet. Le sevrage est une phase de stress pour les porcelets. On pense que ce stress diminue l'efficacité de leur système immunitaire et augmente leur susceptibilité à la colonisation des *E. coli*. La ED et la PWD se déclarent généralement pendant les deux

premières semaines du sevrage porcin, le but de la thérapie préventive dans ce cas serait de protéger temporairement les porcelets en modulant la sécrétion de l'ApoAI et de l'ApoB dans l'intestin. Après cette période de sensibilité, un retour à une diète normal peut être envisagé, où les porcelets deviennent résistants à la colonisation des *E. coli* pathogènes.

CONCLUSION

En conclusion, la colonisation de l'hôte débute d'abord par une interaction intime entre la cellule hôte et un pathogène. L'important rôle de l'adhésine AIDA-I dans la colonisation des porcs dans le cadre de la ED et de la PWD nous a poussé à étudier son récepteur cellulaire putatif, précédemment identifié comme étant l'apolipoprotéine AI, la protéine majoritaire des HDL intervenant dans le transport inverse du cholestérol. Notre étude a montré que AIDA-I purifiée se lie à l'ApoAI en présence de détergents mais également aux ApoB et E2, des composantes de lipoprotéines des mammifères. Cette interaction est spécifique à AIDA-I, car TibA, une autre SAAT, ne s'associe pas à ces composantes. D'autre part, nous avons montré que les bactéries AIDA-I+ n'interagissent pas avec la forme libre de l'ApoAI mais spécifiquement à sa forme associée aux membranes cellulaires. Le rôle comme récepteur cellulaire d'AIDA-I de l'ApoAI dans l'adhésion de ces bactéries n'a pas pu être confirmé par l'infection de cellules épithéliales HEP-2 en présence d'anticorps dirigés contre l'ApoAI et par la surexpression de l'ApoAI dans des cellules sécrétrices d'ApoAI. Nos résultats suggèrent davantage que l'ApoAI ne participe pas au phénomène d'adhésion cellulaire des bactéries exprimant AIDA-I, sans toutefois exclure complètement l'hypothèse. Il est possible que AIDA-I interagisse avec une autre protéine cellulaire pour parvenir à l'adhésion mais que l'association avec l'ApoAI soit nécessaire à la colonisation des intestins des porcelets.

Est-ce que l'ApoAI participe à l'adhésion des bactéries exprimant AIDA-I? Si non, que pourrait être le rôle de l'ApoAI dans l'association avec AIDA-I? Comment l'ApoAI est-elle ciblée spécifiquement vers la surface cellulaire sans la machinerie de biogénèse des HDL? Ces questions sont sans réponse. Afin de mieux caractériser le rôle potentiel de cette interaction, il serait intéressant de cartographier les domaines interagissant entre les deux protéines à savoir si cette association s'effectue via les domaines d'adhésion de AIDA-I et dans l'amas d'hélices- α de l'ApoAI, où ses domaines fonctionnels sont répertoriés. D'autre part, afin de tester le rôle de cette interaction dans la pathogénèse et de confirmer le modèle infectieux des bactéries AIDA-I+ dans la ED et PWD que nous proposons, nous pourrions infecter des porcelets nouveau-nés nourris avec différentes diètes lipidiques. De ces infections, il serait possible d'observer si l'absence de lipides dans la diète du sevrage permet la potentialisation de la colonisation des porcelets par les *E. coli* exprimant AIDA-I et valider le modèle proposé dans notre étude. Évidemment, ce modèle serait d'abord confirmé en infection *in vitro* sur des

cellules sécrétrices d'ApoAI comme les Caco-2. Somme toute, le rôle de l'association des bactéries exprimant AIDA-I à l'ApoAI reste mystérieux.

BIBLIOGRAPHIE

- 1 De Graaf, F. K. & Mooi, F. R. The fimbrial adhesins of *Escherichia coli*. *Adv Microb Physiol* **28**, 65-143, (1986).
- 2 Fitzgerald, J. R. *et al.* Fibronectin-binding proteins of *Staphylococcus aureus* mediate activation of human platelets via fibrinogen and fibronectin bridges to integrin GPIIb/IIIa and IgG binding to the FcγRIIIa receptor. *Mol Microbiol* **59**, 212-230, (2006).
- 3 Kuhn, I., Tullus, K. & Mollby, R. Colonization and persistence of *Escherichia coli* phenotypes in the intestines of children aged 0 to 18 months. *Infection* **14**, 7-12, (1986).
- 4 Belanger, L. *et al.* *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **62**, 1-10, (2011).
- 5 Kaper, J. B., Nataro, J. P. & Mobley, H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-140, (2004).
- 6 Jerse, A. E., Yu, J., Tall, B. D. & Kaper, J. B. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 7839-7843, (1990).
- 7 Lieberman, J. A. *et al.* Outer membrane targeting, ultrastructure, and single molecule localization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type IV pilus secretin BfpB. *J Bacteriol* **194**, 1646-1658, (2012).
- 8 Moreira, C. G. *et al.* Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **188**, 3952-3961, (2006).
- 9 Bardiau, M., Szalo, M. & Mainil, J. G. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Vet Res* **41**, 57, (2010).
- 10 Brigotti, M. *et al.* Change in conformation with reduction of alpha-helix content causes loss of neutrophil binding activity in fully cytotoxic Shiga toxin 1. *J Biol Chem* **286**, 34514-34521, (2011).
- 11 Yin, X. *et al.* Contributions of O island 48 to adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to epithelial cells in vitro and in ligated pig ileal loops. *Appl Environ Microbiol* **75**, 5779-5786, (2009).

- 12 Iyoda, S. *et al.* Coordinate control of the locus of enterocyte effacement and enterohemolysin genes by multiple common virulence regulators in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **79**, 4628-4637, (2011).
- 13 Rump, L. V. *et al.* Complete DNA Sequence Analysis of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Plasmid pO157_2 in beta-Glucuronidase-Positive *E. coli* O157:H7 Reveals a Novel Evolutionary Path. *J Bacteriol* **194**, 3457-3463, (2012).
- 14 Wolf, M. K. Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **10**, 569-584, (1997).
- 15 Nagy, B. & Fekete, P. Z. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) in farm animals. *Vet Res* **30**, 259-284, (1999).
- 16 Sack, R. B. The discovery of cholera - like enterotoxins produced by *Escherichia coli* causing secretory diarrhoea in humans. *Indian J Med Res* **133**, 171-180, (2011).
- 17 Velarde, J. J. *et al.* Solution structure of the novel dispersin protein of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **66**, 1123-1135, (2007).
- 18 Vial, P. A. *et al.* Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J Infect Dis* **158**, 70-79, (1988).
- 19 Steiner, T. S., Nataro, J. P., Poteet-Smith, C. E., Smith, J. A. & Guerrant, R. L. Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* **105**, 1769-1777, (2000).
- 20 Jiang, Z. D., Greenberg, D., Nataro, J. P., Steffen, R. & DuPont, H. L. Rate of occurrence and pathogenic effect of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in international travelers. *J Clin Microbiol* **40**, 4185-4190, (2002).
- 21 Menard, L. P. & Dubreuil, J. D. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* **28**, 43-60, (2002).
- 22 Moreno, A. C., Ferreira, K. S., Ferreira, L. G., Almeida, S. R. & Martinez, M. B. Recognition of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella flexneri* by dendritic cells: distinct dendritic cell activation states. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 138-141, (2012).

- 23 Venkatesan, M. M., Buysse, J. M. & Kopecko, D. J. Characterization of invasion plasmid antigen genes (ipaBCD) from *Shigella flexneri*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 9317-9321, (1988).
- 24 Venkatesan, M., Buysse, J. M., Vandendries, E. & Kopecko, D. J. Development and testing of invasion-associated DNA probes for detection of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **26**, 261-266, (1988).
- 25 Charles, M., Perez, M., Kobil, J. H. & Goldberg, M. B. Polar targeting of *Shigella* virulence factor IcsA in Enterobacteriaceae and *Vibrio*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 9871-9876, (2001).
- 26 Parsot, C. *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli* pathogenicity factors. *FEMS Microbiol Lett* **252**, 11-18, (2005).
- 27 Servin, A. L. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **18**, 264-292, (2005).
- 28 Semiramoth, N. *et al.* *Escherichia coli* type 1 pili trigger late IL-8 production by neutrophil-like differentiated PLB-985 cells through a Src family kinase- and MAPK-dependent mechanism. *J Leukoc Biol* **85**, 310-321, (2009).
- 29 Benz, I. & Schmidt, M. A. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**, 1506-1511, (1989).
- 30 Porter, P., Noakes, D. E. & Allen, W. D. Secretory IgA and antibodies to *Escherichia coli* in porcine colostrum and milk and their significance in the alimentary tract of the young pig. *Immunology* **18**, 245-257, (1970).
- 31 Madec, F., Bridoux, N., Bounaix, S. & Jestin, A. Measurement of digestive disorders in the piglet at weaning and related risk factors. *Prev Vet Med* **35**, 53-72, (1998).
- 32 Hampson, D. J. & Smith, W. C. Influence of creep feeding and dietary intake after weaning on malabsorption and occurrence of diarrhoea in the newly weaned pig. *Res Vet Sci* **41**, 63-69, (1986).
- 33 Laine, T. M., Lyytikainen, T., Yliaho, M. & Anttila, M. Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland. *Acta Vet Scand* **50**, 21, (2008).
- 34 Hampson, D. J. Alterations in piglet small intestinal structure at weaning. *Res Vet Sci* **40**, 32-40, (1986).

- 35 Hampson, D. J. & Kidder, D. E. Influence of creep feeding and weaning on brush border enzyme activities in the piglet small intestine. *Res Vet Sci* **40**, 24-31, (1986).
- 36 Kidder, D. E. & Manners, M. J. The level of distribution of carbohydrases in the small intestine mucosa of pigs from 3 weeks of age to maturity. *Br J Nutr* **43**, 141-153, (1980).
- 37 Melin, L., Katouli, M., Lindberg, A., Fossum, C. & Wallgren, P. Weaning of piglets. Effects of an exposure to a pathogenic strain of *Escherichia coli*. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **47**, 663-675, (2000).
- 38 Madec, F. *et al.* Experimental models of porcine post-weaning colibacillosis and their relationship to post-weaning diarrhoea and digestive disorders as encountered in the field. *Vet Microbiol* **72**, 295-310, (2000).
- 39 Blecha, F., Pollmann, D. S. & Nichols, D. A. Weaning pigs at an early age decreases cellular immunity. *J Anim Sci* **56**, 396-400, (1983).
- 40 Kick, A. R., Tompkins, M. B., Flowers, W. L., Whisnant, C. S. & Almond, G. W. Effects of stress associated with weaning on the adaptive immune system in pigs. *J Anim Sci* **90**, 649-656, (2012).
- 41 Bailey, M., Clarke, C. J., Wilson, A. D., Williams, N. A. & Stokes, C. R. Depressed potential for interleukin-2 production following early weaning of piglets. *Vet Immunol Immunopathol* **34**, 197-207, (1992).
- 42 Amezcua, R., Friendship, R. M., Dewey, C. E., Gyles, C. & Fairbrother, J. M. Presentation of postweaning *Escherichia coli* diarrhea in southern Ontario, prevalence of hemolytic *E. coli* serogroups involved, and their antimicrobial resistance patterns. *Can J Vet Res* **66**, 73-78, (2002).
- 43 Moxley, R. A. Edema disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract* **16**, 175-185, (2000).
- 44 Oanh, T. K., Nguyen, V. K., De Greve, H. & Goddeeris, B. M. Protection of piglets against Edema disease by maternal immunization with Stx2e toxoid. *Infect Immun* **80**, 469-473, (2012).
- 45 Moonens, K. *et al.* Structural Insight in Histo-Blood Group Binding by the F18 Fimbrial Adhesin FedF. *Mol Microbiol*, (2012).

- 46 Bao, W. B. *et al.* Study on the age-dependent tissue expression of FUT1 gene in porcine and its relationship to E. coli F18 receptor. *Gene* **497**, 336-339, (2012).
- 47 Vu Khac, H. *et al.* Serotypes, virulence genes, and PFGE profiles of Escherichia coli isolated from pigs with postweaning diarrhoea in Slovakia. *BMC Vet Res* **2**, 10, (2006).
- 48 Zhang, W., Zhao, M., Ruesch, L., Omot, A. & Francis, D. Prevalence of virulence genes in Escherichia coli strains recently isolated from young pigs with diarrhea in the US. *Vet Microbiol* **123**, 145-152, (2007).
- 49 Cheng, D., Sun, H., Xu, J. & Gao, S. PCR detection of virulence factor genes in Escherichia coli isolates from weaned piglets with edema disease and/or diarrhea in China. *Vet Microbiol* **115**, 320-328, (2006).
- 50 Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D. M. & Fairbrother, J. M. Isolation and association of Escherichia coli AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. *J Vet Diagn Invest* **15**, 242-252, (2003).
- 51 Ha, S. K. *et al.* Genotypic prevalence of the adhesin involved in diffuse adherence in Escherichia coli isolates in pre-weaned pigs with diarrhoea in Korea. *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health* **51**, 166-168, (2004).
- 52 Zhao, L., Chen, X., Xu, X., Song, G. & Liu, X. Analysis of the AIDA-I gene sequence and prevalence in Escherichia coli isolates from pigs with post-weaning diarrhoea and oedema disease. *Vet J* **180**, 124-129, (2009).
- 53 Niewerth, U. *et al.* The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in Escherichia coli isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. *Clin Diagn Lab Immunol* **8**, 143-149, (2001).
- 54 Zajacova, Z. S., Konstantinova, L. & Alexa, P. Detection of virulence factors of Escherichia coli focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains. *Vet Microbiol* **154**, 369-375, (2012).
- 55 Mainil, J. G., Jacquemin, E., Pohl, P., Kaeckenbeeck, A. & Benz, I. DNA sequences coding for the F18 fimbriae and AIDA adhesin are localised on the same plasmid in Escherichia coli isolates from piglets. *Vet Microbiol* **86**, 303-311, (2002).
- 56 Jallat, C., Darfeuille-Michaud, A., Rich, C. & Joly, B. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic Escherichia coli: diffusely adhering E. coli strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol* **145**, 621-632, (1994).

- 57 Oanh, T. K., Nguyen, V. K., Do, T. N., Goddeeris, B. M. & De Greve, H. Escherichia coli strains causing edema disease in northern Vietnam share an identical verotoxin 2e. *Trop Anim Health Prod* **42**, 1797-1804, (2010).
- 58 Matise, I., Cornick, N. A., Samuel, J. E. & Moon, H. W. Binding of shiga toxin 2e to porcine erythrocytes in vivo and in vitro. *Infect Immun* **71**, 5194-5201, (2003).
- 59 Ravi, M. *et al.* Contribution of AIDA-I to the pathogenicity of a porcine diarrheagenic Escherichia coli and to intestinal colonization through biofilm formation in pigs. *Vet Microbiol* **120**, 308-319, (2007).
- 60 Cote, J. P. *et al.* Identification and mechanism of evolution of new alleles coding for the AIDA-I autotransporter of porcine pathogenic Escherichia coli. *Appl Environ Microbiol* **78**, 4597-4605, (2012).
- 61 Choi, C. *et al.* Antimicrobial susceptibility of pathogenic Escherichia coli isolated from pigs in Korea. *J Vet Med Sci* **64**, 71-73, (2002).
- 62 Casewell, M., Friis, C., Marco, E., McMullin, P. & Phillips, I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. *J Antimicrob Chemother* **52**, 159-161, (2003).
- 63 Heo, J. M. *et al.* Gastrointestinal health and function in weaned pigs: a review of feeding strategies to control post-weaning diarrhoea without using in-feed antimicrobial compounds. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)*, (2012).
- 64 Cutler, S. A., Lonergan, S. M., Cornick, N., Johnson, A. K. & Stahl, C. H. Dietary inclusion of colicin e1 is effective in preventing postweaning diarrhea caused by F18-positive Escherichia coli in pigs. *Antimicrob Agents Chemother* **51**, 3830-3835, (2007).
- 65 Fairbrother, J. M., Nadeau, E. & Gyles, C. L. Escherichia coli in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**, 17-39, (2005).
- 66 Maurer, J., Jose, J. & Meyer, T. F. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. *J Bacteriol* **181**, 7014-7020, (1999).
- 67 Wilhelm, S. *et al.* Functional cell-surface display of a lipase-specific chaperone. *Chembiochem* **8**, 55-60, (2007).

- 68 Girard, V. & Mourez, M. Adhesion mediated by autotransporters of Gram-negative bacteria: structural and functional features. *Res Microbiol* **157**, 407-416, (2006).
- 69 Khan, S., Mian, H. S., Sandercock, L. E., Chirgadze, N. Y. & Pai, E. F. Crystal structure of the passenger domain of the Escherichia coli autotransporter EspP. *J Mol Biol* **413**, 985-1000, (2011).
- 70 Hiss, J. A. & Schneider, G. Domain organization of long autotransporter signal sequences. *Bioinform Biol Insights* **3**, 189-204, (2009).
- 71 Stanley, N. R., Palmer, T. & Berks, B. C. The twin arginine consensus motif of Tat signal peptides is involved in Sec-independent protein targeting in Escherichia coli. *J Biol Chem* **275**, 11591-11596, (2000).
- 72 Jiang, X., Ruiz, T. & Mintz, K. P. The extended signal peptide of the trimeric autotransporter EmaA of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* modulates secretion. *J Bacteriol* **193**, 6983-6994, (2011).
- 73 Leo, J. C., Grin, I. & Linke, D. Type V secretion: mechanism(s) of autotransport through the bacterial outer membrane. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **367**, 1088-1101, (2012).
- 74 Benz, I. & Schmidt, M. A. Structures and functions of autotransporter proteins in microbial pathogens. *Int J Med Microbiol* **301**, 461-468, (2011).
- 75 Lyskowski, A., Leo, J. C. & Goldman, A. Structure and biology of trimeric autotransporter adhesins. *Adv Exp Med Biol* **715**, 143-158, (2011).
- 76 Jain, S. & Goldberg, M. B. Requirement for YaeT in the outer membrane assembly of autotransporter proteins. *J Bacteriol* **189**, 5393-5398, (2007).
- 77 Charbonneau, M. E., Berthiaume, F. & Mourez, M. Proteolytic processing is not essential for multiple functions of the Escherichia coli autotransporter adhesin involved in diffuse adherence (AIDA-I). *J Bacteriol* **188**, 8504-8512, (2006).
- 78 Benz, I. & Schmidt, M. A. Isolation and serologic characterization of AIDA-I, the adhesin mediating the diffuse adherence phenotype of the diarrhea-associated Escherichia coli strain 2787 (O126:H27). *Infect Immun* **60**, 13-18, (1992).
- 79 Charbonneau, M. E. *et al.* O-linked glycosylation ensures the normal conformation of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* **189**, 8880-8889, (2007).

- 80 Charbonneau, M. E. & Mourez, M. Functional organization of the autotransporter adhesin involved in diffuse adherence. *J Bacteriol* **189**, 9020-9029, (2007).
- 81 Cote, J. P. & Mourez, M. Structure-function analysis of the TibA self-associating autotransporter reveals a modular organization. *Infect Immun* **79**, 1826-1832, (2011).
- 82 Laarmann, S. & Schmidt, M. A. The Escherichia coli AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. *Microbiology* **149**, 1871-1882, (2003).
- 83 Fang, Y., Ngeleka, M., Middleton, D. M. & Simko, E. Isolation and identification of AIDA-I receptors in porcine intestinal mucus. *Vet Microbiol* **126**, 345-355, (2008).
- 84 Lohr, M. *et al.* Serum levels of extracellular matrix in acute pancreatitis. *Hepato gastroenterology* **46**, 3263-3270, (1999).
- 85 Fink, D. L., Buscher, A. Z., Green, B., Fernsten, P. & St Geme, J. W., 3rd. The Haemophilus influenzae Hap autotransporter mediates microcolony formation and adherence to epithelial cells and extracellular matrix via binding regions in the C-terminal end of the passenger domain. *Cell Microbiol* **5**, 175-186, (2003).
- 86 Alamuri, P. *et al.* Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen Proteus mirabilis. *Infect Immun* **78**, 4882-4894, (2010).
- 87 Valle, J. *et al.* UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic Escherichia coli. *J Bacteriol* **190**, 4147-4161, (2008).
- 88 Graham, M. F. *et al.* Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology* **94**, 257-265, (1988).
- 89 Rothblat, G. H. & Phillips, M. C. High-density lipoprotein heterogeneity and function in reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* **21**, 229-238, (2010).
- 90 Soran, H., Hama, S., Yadav, R. & Durrington, P. N. HDL functionality. *Curr Opin Lipidol* **23**, 353-366, (2012).
- 91 Mains, L. M. *et al.* Identification of apolipoprotein A1 in the human embryonic secretome. *Fertil Steril* **96**, 422-427 e422, (2011).

- 92 Dobson, C. B., Sales, S. D., Hoggard, P., Wozniak, M. A. & Crutcher, K. A. The receptor-binding region of human apolipoprotein E has direct anti-infective activity. *J Infect Dis* **193**, 442-450, (2006).
- 93 Tanaka, N., Abe-Dohmae, S., Iwamoto, N., Fitzgerald, M. L. & Yokoyama, S. Helical apolipoproteins of high-density lipoprotein enhance phagocytosis by stabilizing ATP-binding cassette transporter A7. *J Lipid Res* **51**, 2591-2599, (2010).
- 94 Biedzka-Sarek, M. *et al.* Apolipoprotein A-I exerts bactericidal activity against *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *J Biol Chem* **286**, 38211-38219, (2011).
- 95 Giangrande, C. *et al.* Innate immunity probed by lipopolysaccharides affinity strategy and proteomics. *Anal Bioanal Chem*, (2012).
- 96 Choudhury, M., Yamada, S., Komatsu, M., Kishimura, H. & Ando, S. Homologue of mammalian apolipoprotein A-II in non-mammalian vertebrates. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **41**, 370-378, (2009).
- 97 Halliday, D. C. *et al.* Genes induced during the early developmental stages of the Cane Toad, *Bufo (Chaunus) marinus*. *Gene Expr Patterns* **8**, 424-432, (2008).
- 98 Cain, W., Song, L., Stephens, G. & Usher, D. Characterization of lipoproteins from the turtle, *Trachemys scripta elegans*, in fasted and fed states. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **134**, 783-794, (2003).
- 99 Yue, H. Y. *et al.* Effects of dietary oxidized oil on laying performance, lipid metabolism, and apolipoprotein gene expression in laying hens. *Poult Sci* **90**, 1728-1736, (2011).
- 100 Eyckmans, M. *et al.* Comparative proteomics of copper exposure and toxicity in rainbow trout, common carp and gibel carp. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics* **7**, 220-232, (2012).
- 101 Charron, J. B., Ouellet, F., Houde, M. & Sarhan, F. The plant Apolipoprotein D ortholog protects *Arabidopsis* against oxidative stress. *BMC Plant Biol* **8**, 86, (2008).
- 102 Ruiz, M., Sanchez, D., Canal, I., Acebes, A. & Ganfornina, M. D. Sex-dependent modulation of longevity by two *Drosophila* homologues of human Apolipoprotein D, GLaz and NLaz. *Exp Gerontol* **46**, 579-589, (2011).
- 103 Gupta, L. *et al.* Apolipophorin-III mediates antiplasmodial epithelial responses in *Anopheles gambiae* (G3) mosquitoes. *PLoS One* **5**, e15410, (2010).

- 104 Cole, K. D. *et al.* Primary structure and comparative sequence analysis of an insect apolipoprotein. Apolipoprotein-III from *Manduca sexta*. *J Biol Chem* **262**, 11794-11800, (1987).
- 105 Avarre, J. C., Lubzens, E. & Babin, P. J. Apolipocrustacein, formerly vitellogenin, is the major egg yolk precursor protein in decapod crustaceans and is homologous to insect apolipoprotein II/I and vertebrate apolipoprotein B. *BMC Evol Biol* **7**, 3, (2007).
- 106 Ding, Y. *et al.* Identification of the major functional proteins of prokaryotic lipid droplets. *J Lipid Res* **53**, 399-411, (2012).
- 107 Brufau, G., Groen, A. K. & Kuipers, F. Reverse cholesterol transport revisited: contribution of biliary versus intestinal cholesterol excretion. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1726-1733, (2011).
- 108 Weiler-Guttler, H. *et al.* Synthesis of apolipoprotein A-1 in pig brain microvascular endothelial cells. *J Neurochem* **54**, 444-450, (1990).
- 109 Provost, P. R., Boucher, E. & Tremblay, Y. Apolipoprotein A-I, A-II, C-II, and H expression in the developing lung and sex difference in surfactant lipids. *J Endocrinol* **200**, 321-330, (2009).
- 110 Sviridov, D. Maturation of apolipoprotein A-I: unrecognized health benefit or a forgotten rudiment? *J Lipid Res* **50**, 1257-1258, (2009).
- 111 Chau, P., Fielding, P. E. & Fielding, C. J. Bone morphogenetic protein-1 (BMP-1) cleaves human proapolipoprotein A1 and regulates its activation for lipid binding. *Biochemistry* **46**, 8445-8450, (2007).
- 112 Di Angelantonio, E. *et al.* Lipid-related markers and cardiovascular disease prediction. *Jama* **307**, 2499-2506, (2012).
- 113 Asztalos, B. F., Tani, M. & Schaefer, E. J. Metabolic and functional relevance of HDL subspecies. *Curr Opin Lipidol* **22**, 176-185, (2011).
- 114 Shen, B. W., Scanu, A. M. & Kezdy, F. J. Structure of human serum lipoproteins inferred from compositional analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 837-841, (1977).
- 115 Meyer, J. M., Ji, A., Cai, L. & van der Westhuyzen, D. R. High-capacity selective uptake of cholesteryl ester from native LDL during macrophage foam cell formation. *J Lipid Res*, (2012).

- 116 Zhao, B., Bie, J., Wang, J., Marqueen, S. A. & Ghosh, S. Identification of a novel intracellular Cholesteryl Ester Hydrolase (CES3) in human macrophages: Compensatory increase in its expression after CES1 silencing. *Am J Physiol Cell Physiol*, (2012).
- 117 Reifenberg, K. *et al.* Overexpression of TGF-ss1 in Macrophages Reduces and Stabilizes Atherosclerotic Plaques in ApoE-Deficient Mice. *PLoS One* **7**, e40990, (2012).
- 118 Smedbakken, L. M. *et al.* Increased levels of the homeostatic chemokine CXCL13 in human atherosclerosis - Potential role in plaque stabilization. *Atherosclerosis*, (2012).
- 119 Dushkin, M. I. Macrophage/Foam cell is an attribute of inflammation: mechanisms of formation and functional role. *Biochemistry (Mosc)* **77**, 327-338, (2012).
- 120 Mulya, A. *et al.* Initial interaction of apoA-I with ABCA1 impacts in vivo metabolic fate of nascent HDL. *J Lipid Res* **49**, 2390-2401, (2008).
- 121 Denis, M., Landry, Y. D. & Zha, X. ATP-binding cassette A1-mediated lipidation of apolipoprotein A-I occurs at the plasma membrane and not in the endocytic compartments. *J Biol Chem* **283**, 16178-16186, (2008).
- 122 Liu, L. *et al.* Effects of apolipoprotein A-I on ATP-binding cassette transporter A1-mediated efflux of macrophage phospholipid and cholesterol: formation of nascent high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* **278**, 42976-42984, (2003).
- 123 Krimbou, L. *et al.* Biogenesis and speciation of nascent apoA-I-containing particles in various cell lines. *J Lipid Res* **46**, 1668-1677, (2005).
- 124 Duong, P. T. *et al.* Characterization of nascent HDL particles and microparticles formed by ABCA1-mediated efflux of cellular lipids to apoA-I. *J Lipid Res* **47**, 832-843, (2006).
- 125 Schaefer, E. J., Santos, R. D. & Asztalos, B. F. Marked HDL deficiency and premature coronary heart disease. *Curr Opin Lipidol* **21**, 289-297, (2010).
- 126 Singaraja, R. R. *et al.* Increased ABCA1 activity protects against atherosclerosis. *J Clin Invest* **110**, 35-42, (2002).
- 127 Van Eck, M. *et al.* Macrophage ATP-binding cassette transporter A1 overexpression inhibits atherosclerotic lesion progression in low-density lipoprotein receptor knockout mice. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26**, 929-934, (2006).

- 128 Igarashi, M. *et al.* The critical role of neutral cholesterol ester hydrolase 1 in cholesterol removal from human macrophages. *Circ Res* **107**, 1387-1395, (2010).
- 129 Nagashima, S. *et al.* Depot-specific expression of lipolytic genes in human adipose tissues--association among CES1 expression, triglyceride lipase activity and adiposity. *J Atheroscler Thromb* **18**, 190-199, (2011).
- 130 Chambenoit, O. *et al.* Specific docking of apolipoprotein A-I at the cell surface requires a functional ABCA1 transporter. *J Biol Chem* **276**, 9955-9960, (2001).
- 131 Nagao, K. *et al.* Enhanced apoA-I-dependent cholesterol efflux by ABCA1 from sphingomyelin-deficient Chinese hamster ovary cells. *J Biol Chem* **282**, 14868-14874, (2007).
- 132 Ong, D. S. *et al.* Extracellular cholesterol-rich microdomains generated by human macrophages and their potential function in reverse cholesterol transport. *J Lipid Res* **51**, 2303-2313, (2010).
- 133 Hamon, Y. *et al.* ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nat Cell Biol* **2**, 399-406, (2000).
- 134 Williamson, P. *et al.* Transbilayer phospholipid movements in ABCA1-deficient cells. *PLoS One* **2**, e729, (2007).
- 135 Panagotopoulos, S. E. *et al.* The role of apolipoprotein A-I helix 10 in apolipoprotein-mediated cholesterol efflux via the ATP-binding cassette transporter ABCA1. *J Biol Chem* **277**, 39477-39484, (2002).
- 136 Chao, W. T., Tsai, S. H., Lin, Y. C., Lin, W. W. & Yang, V. C. Cellular localization and interaction of ABCA1 and caveolin-1 in aortic endothelial cells after HDL incubation. *Biochem Biophys Res Commun* **332**, 743-749, (2005).
- 137 Fitzgerald, M. L. *et al.* ABCA1 and amphipathic apolipoproteins form high-affinity molecular complexes required for cholesterol efflux. *J Lipid Res* **45**, 287-294, (2004).
- 138 Nagao, K. *et al.* ATP hydrolysis-dependent conformational changes in the extracellular domain of ABCA1 are associated with apoA-I binding. *J Lipid Res* **53**, 126-136, (2012).
- 139 Nagao, K., Kimura, Y. & Ueda, K. Lysine residues of ABCA1 are required for the interaction with apoA-I. *Biochim Biophys Acta* **1821**, 530-535, (2012).

- 140 Vedhachalam, C. *et al.* Influence of apolipoprotein (Apo) A-I structure on nascent high density lipoprotein (HDL) particle size distribution. *J Biol Chem* **285**, 31965-31973, (2010).
- 141 Azuma, Y. *et al.* Retroendocytosis pathway of ABCA1/apoA-I contributes to HDL formation. *Genes Cells* **14**, 191-204, (2009).
- 142 Takahashi, Y. & Smith, J. D. Cholesterol efflux to apolipoprotein AI involves endocytosis and resecretion in a calcium-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11358-11363, (1999).
- 143 Rader, D. J. Molecular regulation of HDL metabolism and function: implications for novel therapies. *J Clin Invest* **116**, 3090-3100, (2006).
- 144 Cavigiolio, G. *et al.* The interplay between size, morphology, stability, and functionality of high-density lipoprotein subclasses. *Biochemistry* **47**, 4770-4779, (2008).
- 145 Sparks, D. L. & Pritchard, P. H. Transfer of cholesteryl ester into high density lipoprotein by cholesteryl ester transfer protein: effect of HDL lipid and apoprotein content. *J Lipid Res* **30**, 1491-1498, (1989).
- 146 Sparks, D. L., Frank, P. G., Braschi, S., Neville, T. A. & Marcel, Y. L. Effect of apolipoprotein A-I lipidation on the formation and function of pre-beta and alpha-migrating LpA-I particles. *Biochemistry* **38**, 1727-1735, (1999).
- 147 Li, H. H. *et al.* ApoA-I structure on discs and spheres. Variable helix registry and conformational states. *J Biol Chem* **277**, 39093-39101, (2002).
- 148 Gauthamadasa, K. *et al.* Apolipoprotein A-II-mediated conformational changes of apolipoprotein A-I in discoidal high density lipoproteins. *J Biol Chem* **287**, 7615-7625, (2012).
- 149 Colvin, P. L., Moriguchi, E., Barrett, P. H., Parks, J. S. & Rudel, L. L. Small HDL particles containing two apoA-I molecules are precursors in vivo to medium and large HDL particles containing three and four apoA-I molecules in nonhuman primates. *J Lipid Res* **40**, 1782-1792, (1999).
- 150 Pussinen, P. J. *et al.* Binding of phospholipid transfer protein (PLTP) to apolipoproteins A-I and A-II: location of a PLTP binding domain in the amino terminal region of apoA-I. *J Lipid Res* **39**, 152-161, (1998).

- 151 Marcel, Y. L. *et al.* Distribution and concentration of cholesteryl ester transfer protein in plasma of normolipemic subjects. *J Clin Invest* **85**, 10-17, (1990).
- 152 Pownall, H. J. & Ehnholm, C. The unique role of apolipoprotein A-I in HDL remodeling and metabolism. *Curr Opin Lipidol* **17**, 209-213, (2006).
- 153 Rye, K. A. & Barter, P. J. Formation and metabolism of prebeta-migrating, lipid-poor apolipoprotein A-I. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **24**, 421-428, (2004).
- 154 Shinkai, H. Cholesteryl ester transfer-protein modulator and inhibitors and their potential for the treatment of cardiovascular diseases. *Vasc Health Risk Manag* **8**, 323-331, (2012).
- 155 Annema, W. & Tietge, U. J. Role of hepatic lipase and endothelial lipase in high-density lipoprotein-mediated reverse cholesterol transport. *Curr Atheroscler Rep* **13**, 257-265, (2011).
- 156 Lorenzi, I., von Eckardstein, A., Radosavljevic, S. & Rohrer, L. Lipidation of apolipoprotein A-I by ATP-binding cassette transporter (ABC) A1 generates an interaction partner for ABCG1 but not for scavenger receptor BI. *Biochim Biophys Acta* **1781**, 306-313, (2008).
- 157 de Beer, M. C. *et al.* Apolipoprotein A-I conformation markedly influences HDL interaction with scavenger receptor BI. *J Lipid Res* **42**, 309-313, (2001).
- 158 Yvan-Charvet, L. *et al.* SR-BI inhibits ABCG1-stimulated net cholesterol efflux from cells to plasma HDL. *J Lipid Res* **49**, 107-114, (2008).
- 159 Link, J. J., Rohatgi, A. & de Lemos, J. A. HDL cholesterol: physiology, pathophysiology, and management. *Curr Probl Cardiol* **32**, 268-314, (2007).
- 160 Nieland, T. J., Penman, M., Dori, L., Krieger, M. & Kirchhausen, T. Discovery of chemical inhibitors of the selective transfer of lipids mediated by the HDL receptor SR-BI. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15422-15427, (2002).
- 161 Mahley, R. W., Huang, Y. & Weisgraber, K. H. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J Clin Invest* **116**, 1226-1229, (2006).
- 162 Wang, H. *et al.* Regulation of apolipoprotein secretion by long-chain polyunsaturated fatty acids in newborn swine enterocytes. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **280**, G1137-1144, (2001).

- 163 Danielsen, E. M., Hansen, G. H. & Poulsen, M. D. Apical secretion of apolipoproteins from enterocytes. *J Cell Biol* **120**, 1347-1356, (1993).
- 164 Wang, H. *et al.* Regulation of intestinal apolipoprotein A-I synthesis by dietary phosphatidylcholine in newborn swine. *Lipids* **36**, 683-687, (2001).
- 165 Black, D. D. & Rohwer-Nutter, P. L. Intestinal apolipoprotein synthesis in the newborn piglet. *Pediatr Res* **29**, 32-38, (1991).
- 166 Danielsen, E. M., Hansen, G. H., Rasmussen, K., Niels-Christiansen, L. L. & Frenzel, F. Apolipoprotein A-1 (apoA-1) deposition in, and release from, the enterocyte brush border: a possible role in transintestinal cholesterol efflux (TICE)? *Biochim Biophys Acta* **1818**, 530-536, (2012).
- 167 van der Velde, A. E. *et al.* Direct intestinal cholesterol secretion contributes significantly to total fecal neutral sterol excretion in mice. *Gastroenterology* **133**, 967-975, (2007).
- 168 Collet, X., Perret, B., Simard, G., Raffai, E. & Marcel, Y. L. Differential effects of lecithin and cholesterol on the immunoreactivity and conformation of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J Biol Chem* **266**, 9145-9152, (1991).
- 169 Roberts, L. M. *et al.* Structural analysis of apolipoprotein A-I: limited proteolysis of methionine-reduced and -oxidized lipid-free and lipid-bound human apo A-I. *Biochemistry* **36**, 7615-7624, (1997).
- 170 Lund-Katz, S. & Phillips, M. C. High density lipoprotein structure-function and role in reverse cholesterol transport. *Subcell Biochem* **51**, 183-227, (2010).
- 171 Frank, P. G. & Marcel, Y. L. Apolipoprotein A-I: structure-function relationships. *J Lipid Res* **41**, 853-872, (2000).
- 172 Davidson, W. S. & Thompson, T. B. The structure of apolipoprotein A-I in high density lipoproteins. *J Biol Chem* **282**, 22249-22253, (2007).
- 173 Sparks, D. L., Lund-Katz, S. & Phillips, M. C. The charge and structural stability of apolipoprotein A-I in discoidal and spherical recombinant high density lipoprotein particles. *J Biol Chem* **267**, 25839-25847, (1992).
- 174 Ajees, A. A., Anantharamaiah, G. M., Mishra, V. K., Hussain, M. M. & Murthy, H. M. Crystal structure of human apolipoprotein A-I: insights into its protective effect against cardiovascular diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 2126-2131, (2006).

- 175 Tanaka, M. *et al.* Influence of tertiary structure domain properties on the functionality of apolipoprotein A-I. *Biochemistry* **47**, 2172-2180, (2008).
- 176 Saito, H. *et al.* Alpha-helix formation is required for high affinity binding of human apolipoprotein A-I to lipids. *J Biol Chem* **279**, 20974-20981, (2004).
- 177 Huang, R. *et al.* Apolipoprotein A-I structural organization in high-density lipoproteins isolated from human plasma. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 416-422, (2011).
- 178 Narayanaswami, V., Kiss, R. S. & Weers, P. M. The helix bundle: a reversible lipid binding motif. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **155**, 123-133, (2010).
- 179 Olofsson, S. O., Asp, L. & Boren, J. The assembly and secretion of apolipoprotein B-containing lipoproteins. *Curr Opin Lipidol* **10**, 341-346, (1999).
- 180 Rhoads, D. & Brissette, L. Low density lipoprotein uptake: holoparticle and cholesteryl ester selective uptake. *Int J Biochem Cell Biol* **31**, 915-931, (1999).
- 181 Mora, S. *et al.* LDL particle subclasses, LDL particle size, and carotid atherosclerosis in the Multi-Ethnic Study of Atherosclerosis (MESA). *Atherosclerosis* **192**, 211-217, (2007).
- 182 Go, G. W. & Mani, A. Low-density lipoprotein receptor (LDLR) family orchestrates cholesterol homeostasis. *Yale J Biol Med* **85**, 19-28, (2012).
- 183 Henriksen, T., Mahoney, E. M. & Steinberg, D. Enhanced macrophage degradation of biologically modified low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* **3**, 149-159, (1983).
- 184 Sakaguchi, H. *et al.* Role of macrophage scavenger receptors in diet-induced atherosclerosis in mice. *Lab Invest* **78**, 423-434, (1998).
- 185 Steinberg, D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* **272**, 20963-20966, (1997).
- 186 Hussain, M. M. A proposed model for the assembly of chylomicrons. *Atherosclerosis* **148**, 1-15, (2000).
- 187 van Greevenbroek, M. M. & de Bruin, T. W. Chylomicron synthesis by intestinal cells in vitro and in vivo. *Atherosclerosis* **141 Suppl 1**, S9-16, (1998).

- 188 Hinsdale, M. E., Sullivan, P. M., Mezdour, H. & Maeda, N. ApoB-48 and apoB-100 differentially influence the expression of type-III hyperlipoproteinemia in APOE*2 mice. *J Lipid Res* **43**, 1520-1528, (2002).
- 189 Ishibashi, S. *et al.* Role of the low density lipoprotein (LDL) receptor pathway in the metabolism of chylomicron remnants. A quantitative study in knockout mice lacking the LDL receptor, apolipoprotein E, or both. *J Biol Chem* **271**, 22422-22427, (1996).
- 190 Barrans, A. *et al.* Hepatic lipase induces the formation of pre-beta 1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. A study comparing liver perfusion to in vitro incubation with lipases. *J Biol Chem* **269**, 11572-11577, (1994).
- 191 van Raalte, D. H., Li, M., Pritchard, P. H. & Wasan, K. M. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-alpha: a pharmacological target with a promising future. *Pharm Res* **21**, 1531-1538, (2004).
- 192 Bashtovyy, D., Jones, M. K., Anantharamaiah, G. M. & Segrest, J. P. Sequence conservation of apolipoprotein A-I affords novel insights into HDL structure-function. *J Lipid Res* **52**, 435-450, (2011).
- 193 Johnston, L. D. *et al.* Apolipoprotein A-I from striped bass (*Morone saxatilis*) demonstrates antibacterial activity in vitro. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* **151**, 167-175, (2008).
- 194 Ma, J., Liao, X. L., Lou, B. & Wu, M. P. Role of apolipoprotein A-I in protecting against endotoxin toxicity. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* **36**, 419-424, (2004).
- 195 Lindenthal, C. & Elsinghorst, E. A. Identification of a glycoprotein produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**, 4084-4091, (1999).
- 196 Girard, V. *et al.* Conformation change in a self-recognizing autotransporter modulates bacterial cell-cell interaction. *J Biol Chem* **285**, 10616-10626, (2010).
- 197 Gursky, O. Apolipoprotein structure and dynamics. *Curr Opin Lipidol* **16**, 287-294, (2005).
- 198 Segrest, J. P., Jones, M. K., De Loof, H. & Dashti, N. Structure of apolipoprotein B-100 in low density lipoproteins. *J Lipid Res* **42**, 1346-1367, (2001).
- 199 Fisher, C. A. & Ryan, R. O. Lipid binding-induced conformational changes in the N-terminal domain of human apolipoprotein E. *J Lipid Res* **40**, 93-99, (1999).

- 200 Blackett, P. R., Khan, S., Wang, W., Alaupovic, P. & Lee, E. Sex differences in HDL ApoC-III in American Indian youth. *Biol Sex Differ* **3**, 18, (2012).
- 201 Hasebe, A. *et al.* A microbial TLR2 agonist imparts macrophage-activating ability to apolipoprotein A-1. *J Immunol* **177**, 4826-4832, (2006).
- 202 Washburn, L. R. & Somerson, N. L. Lipoproteins as substitutes for serum in Mycoplasma culture medium. *J Clin Microbiol* **10**, 586-589, (1979).
- 203 Efrati, H., Rottem, S. & Razin, S. Lipid and protein membrane components associated with cholesterol uptake by Mycoplasmas. *Biochim Biophys Acta* **641**, 386-394, (1981).
- 204 Mei, C. L. *et al.* Chlamydia pneumoniae induces macrophage-derived foam cell formation via PPAR alpha and PPAR gamma-dependent pathways. *Cell Biol Int* **33**, 301-308, (2009).
- 205 Bashmakov, Y. K., Zigangirova, N. A., Gintzburg, A. L., Bortsov, P. A. & Petyaev, I. M. ApoB-containing lipoproteins promote infectivity of chlamydial species in human hepatoma cell line. *World J Hepatol* **2**, 74-80, (2010).
- 206 Petyaev, I. M., Zigangirova, N. A., Tsibezov, V. V., Ross, A. & Bashmakov, Y. K. Monoclonal antibodies against lipopolysaccharide of Chlamydia trachomatis with cross reactivity to human ApoB. *Hybridoma (Larchmt)* **30**, 131-136, (2011).
- 207 Dittrich, R. *et al.* Endothelial Chlamydia pneumoniae infection promotes oxidation of LDL. *Biochem Biophys Res Commun* **319**, 501-505, (2004).
- 208 Shoenfeld, Y., Wu, R., Dearing, L. D. & Matsuura, E. Are anti-oxidized low-density lipoprotein antibodies pathogenic or protective? *Circulation* **110**, 2552-2558, (2004).
- 209 Gerard, H. C., Fomicheva, E., Whittum-Hudson, J. A. & Hudson, A. P. Apolipoprotein E4 enhances attachment of Chlamydia pneumoniae elementary bodies to host cells. *Microb Pathog* **44**, 279-285, (2008).
- 210 Cox, J. V., Naher, N., Abdelrahman, Y. M. & Belland, R. J. Host HDL biogenesis machinery is recruited to the inclusion of Chlamydia trachomatis-infected cells and regulates chlamydial growth. *Cell Microbiol*, (2012).
- 211 Courtney, H. S., Hasty, D. L. & Dale, J. B. Serum opacity factor (SOF) of Streptococcus pyogenes evokes antibodies that opsonize homologous and heterologous SOF-positive serotypes of group A streptococci. *Infect Immun* **71**, 5097-5103, (2003).

- 212 Courtney, H. S., Zhang, Y. M., Frank, M. W. & Rock, C. O. Serum opacity factor, a streptococcal virulence factor that binds to apolipoproteins A-I and A-II and disrupts high density lipoprotein structure. *J Biol Chem* **281**, 5515-5521, (2006).
- 213 Tchoua, U. *et al.* Serum opacity factor enhances HDL-mediated cholesterol efflux, esterification and anti inflammatory effects. *Lipids* **45**, 1117-1126, (2010).
- 214 Gao, Y., Liang, C., Zhao, R., Lukomski, S. & Han, R. The Scl1 of M41-type group A Streptococcus binds the high-density lipoprotein. *FEMS Microbiol Lett* **309**, 55-61, (2010).
- 215 Han, R. *et al.* Binding of the low-density lipoprotein by streptococcal collagen-like protein Scl1 of Streptococcus pyogenes. *Mol Microbiol* **61**, 351-367, (2006).
- 216 Miyakawa, H., Honma, K., Qi, M. & Kuramitsu, H. K. Interaction of Porphyromonas gingivalis with low-density lipoproteins: implications for a role for periodontitis in atherosclerosis. *J Periodontal Res* **39**, 1-9, (2004).
- 217 Schmidt, H. *et al.* Identification and characterization of a novel genomic island integrated at selC in locus of enterocyte effacement-negative, Shiga toxin-producing Escherichia coli. *Infect Immun* **69**, 6863-6873, (2001).
- 218 Makoveichuk, E., Cherepanov, P., Lundberg, S., Forsberg, A. & Olivecrona, G. pH6 antigen of Yersinia pestis interacts with plasma lipoproteins and cell membranes. *J Lipid Res* **44**, 320-330, (2003).
- 219 Neufeld, E. B. *et al.* Cellular localization and trafficking of the human ABCA1 transporter. *J Biol Chem* **276**, 27584-27590, (2001).
- 220 Gaus, K. *et al.* Apolipoprotein A-1 interaction with plasma membrane lipid rafts controls cholesterol export from macrophages. *Faseb J* **18**, 574-576, (2004).
- 221 Mougin-Schutz, A., Vacher, D. & Girard-Globa, A. Synthesis and secretion of apolipoproteins by pig intestinal mucosa in organ culture. Lack of inhibition of apolipoprotein A-I secretion by colchicine. *Biochim Biophys Acta* **754**, 208-217, (1983).

