

Université de Montréal

Étude de la pathogenèse des infections à *Escherichia coli* de type attachant et effaçant chez le porc

Par

Francis Girard

Département de pathologie et microbiologie

Faculté de médecine vétérinaire

Thèse présentée à la Faculté des études supérieures

En vue de l'obtention du grade de Philosophiae Doctor (Ph.D)

en sciences vétérinaires

option microbiologie

Mars 2005

© Francis Girard, 2005

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Cette thèse intitulée :

Étude de la pathogenèse des infections à *Escherichia coli* de type attachant et effaçant chez le porc

Présentée par
Francis Girard

A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Mario Jacques

Président-rapporteur et Représentant du doyen de la FES

Dr John M. Fairbrother

Directeur de recherche

Dr Marcelo Gottschalk

Membre du jury

Dr Charles M. Dozois

Examineur externe
INRS-Institut Armand-Frappier

Thèse acceptée le : _____

RÉSUMÉ

Les *Escherichia coli* de type attachant et effaçant (AEEC) sont responsables de désordres intestinaux chez l'humain et d'autres espèces animales, telles le lapin, le chien et le porc. Les AEEC, incluant les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et certains *E. coli* producteurs de toxines Shiga (STEC), dont ceux de sérotype O157:H7 (STEC_{O157:H7}), induisent des lésions d'attachement et d'effacement (A/E). Le développement des lésions A/E dépend principalement d'une intimine, d'un récepteur transloqué de l'intimine, le Tir, et de diverses protéines sécrétées (EspA, EspB, EspD). L'importance des divers facteurs de virulence dans la pathogenèse des AEEC, de même que les facteurs impliqués dans la résistance de l'hôte, sont peu ou pas connus chez le porc.

Cette étude démontre l'importance du sous-type d'intimine dans la colonisation des EPEC et STEC_{O157:H7} dans un modèle de culture de segments intestinaux porcins (IVOC). De plus, nos résultats nous indiquent que l'intimine alpha des EPEC humaines interagit avec un autre récepteur que le Tir en IVOC, résultant en un phénotype particulier, caractérisé par l'adhérence quasi intime des bactéries, l'effacement des microvillosités, et l'absence de piédestal.

Cette étude démontre également l'importance du statut immunitaire de l'hôte dans la résistance au développement des lésions A/E chez le porc, et constitue la première caractérisation de la réponse cytokinaire associée à une telle infection *in vivo*. Le développement d'un tel modèle nous a aussi permis de démontrer l'implication de l'intimine et de Tir dans la pathogenèse des infections à EPEC porcins (PEPEC) *in vivo*.

La capacité d'anticorps de poule spécifiques à divers facteurs de virulence des AEEC (intimine, Tir, EspA-B-D) à réduire l'adhérence bactérienne de souches AEEC de diverses espèces animales, dont l'humain, a aussi été évaluée en IVOC, confirmant un potentiel prometteur pour les anticorps ciblant principalement l'intimine et son récepteur Tir. Finalement, l'administration orale de poudre d'œufs enrobée contenant des anticorps de poule anti-intimine s'est avérée efficace à réduire la sévérité des lésions A/E dans le petit intestin de porcs sevrés infectés par une souche PEPEC.

Mis ensemble, ces résultats permettront de mieux comprendre la pathogenèse des infections par les AEEC en IVOC porcins, de même qu'*in vivo* chez le porc sevré.

Mots clés : *Escherichia coli* attachants et effaçants, porc, modèle d'IVOC intestinaux porcins, *in vivo*, virulence, intimine, Tir, cytokines, immunoprophylaxie.

SUMMARY

Attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) are responsible for intestinal disorders in humans and other animal species, including rabbits, dogs, and pigs. AEEC, including enteropathogenic *E. coli* (EPEC) and certain Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), including those of O157:H7 serotype (STEC_{O157:H7}), induce typical attaching and effacing lesions (A/E). The development of A/E lesions depends on many virulence factors, such as an intimin, a translocated intimin receptor Tir, as well as many secreted effector proteins (EspA, EspB, EspD). The importance of such virulence factors, as well as the factors involved in the natural resistance of the host to the development of A/E lesions, are poorly known in the pig.

This study shows the importance of the intimin subtype in the colonization of the small intestinal mucosa by EPEC and STEC_{O157:H7} in an *in vitro* organ culture (IVOC) model using ileal segments of newborn, colostrum-deprived piglets. It also provides evidence of a Tir-independent interaction of intimin alpha of a human EPEC strain with a possible host intimin receptor (HIR), resulting in a phenotype of close adherence with effacement.

This study also shows that the host immune status influences resistance to the development of A/E lesions induced by porcine enteropathogenic *E. coli* (PEPEC) in weaned pigs, and presents for the first time characterization of the proinflammatory cytokine response induced by such a challenge. Moreover, the development of the latter *in vivo* model allowed us to demonstrate the expression *in vivo* of intimin and Tir during infection.

Also, it demonstrates the potential of chicken IgY antibodies directed against intimin and Tir to reduce bacterial intimate adherence of AEEC strains from various animal species, including human EPEC and STEC_{O157:H7}, in the porcine IVOC model. Finally, this study demonstrates that the oral administration of coated egg yolk powder containing anti-intimin antibodies is a promising alternative to antibiotic treatment for the reduction of A/E lesions in the small intestine of weaned pigs following bacterial challenge with a PEPEC strain.

Taken together, the results presented in this study shed light on the pathogenesis of AEEC infection in porcine IVOC, as well as *in vivo* using weaned pigs.

Keywords : Attaching and effacing *Escherichia coli*, pig, porcine intestinal IVOC model, *in vivo*, virulence, intimin, Tir, cytokines, immunoprophylaxis.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	iii
SUMMARY	vi
TABLE DES MATIÈRES.....	ix
LISTE DES TABLEAUX.....	xiv
LISTE DES FIGURES.....	xvi
LISTE DES ABRÉVIATIONS	xxii
REMERCIEMENTS	xxviii
 INTRODUCTION.....	 1
RECENSEMENT DE LA LITTÉRATURE	5
1. Les <i>Escherichia coli</i> pathogènes	6
1.1 Généralités.....	6
1.2 <i>E. coli</i> à tropisme extra-intestinal.....	6
1.3 <i>E. coli</i> à tropisme intestinal	7
1.3.1 Les ETEC	8
1.3.2 Les EPEC	9
1.3.3 Les STEC	10
1.3.4 Les EIEC	11
1.3.5 Les EAggEC.....	11
1.3.6 Les DAEC	12
2. Les <i>Escherichia coli</i> attachants et effaçants.....	13
2.1 Les lésions d'attachement et d'effacement	14
2.2 Le modèle d'infection des EPEC	15
2.3 L'adhérence localisée (LA)	17
2.4 Les réarrangements du cytosquelette cellulaire.....	17
2.5 L'adhérence intime.....	18
2.6 L'invasion de la cellule hôte	20
2.7 L'induction de la diarrhée par les AEEC	21

2.8	La signalisation intracellulaire	24
3.	Autres pathogènes causant des lésions A/E	25
3.1	<i>Citrobacter rodentium</i>	26
3.2	<i>Hafnia alvei</i>	27
4.	Déterminants génétiques des AEEC	27
4.1	Le locus d'effacement des entérocytes (LEE)	27
4.1.1	Le gène <i>eae</i>	30
4.1.2	Le gène <i>tir</i> (translocated intimin receptor)	31
4.1.3	Le système de sécrétion de type III (SSTT)	33
4.1.3.1	Le système de gènes <i>sep</i> (secretion of <i>EPEC</i> proteins)	35
4.1.4	Les gènes <i>esp</i> (<i>EPEC</i> secretory proteins) présents sur le LEE	36
4.1.4.1	Le gène <i>espA</i>	36
4.1.4.2	Le gène <i>espB</i>	38
4.1.4.3	Le gène <i>espD</i>	39
4.1.4.4	Le gène <i>espF</i>	40
4.1.4.5	Autres gènes <i>esp</i>	40
4.1.5	Le gène <i>cesD</i>	41
4.1.6	Le gène <i>cesT</i>	41
4.1.7	Le gène <i>orf19/map</i>	42
4.2	Autres déterminants génétiques des AEEC	43
4.2.1	Autres gènes <i>esp</i>	43
4.2.1.1	Le gène <i>espC</i>	43
4.2.1.2	Les gènes <i>espF_U/tccp</i>	43
4.2.1.3	Le gène <i>espI</i>	44
4.2.1.4	Le gène <i>espJ</i>	45
4.2.2	Le plasmide EAF	45
4.2.2.1	Le système de gènes <i>bfp</i>	46
4.2.2.2	Les gènes de la région <i>per/bfpTVW</i>	47
4.2.3	Le gène <i>bipA</i>	48
4.2.4	Le gène <i>iha</i>	48
4.2.5	Les gènes <i>efa1/lifA</i> et <i>toxB</i>	49

4.2.6	Le gène <i>ompA</i>	50
4.2.7	Le gène <i>cif</i>	51
4.2.8	Les fimbriae longs polaires	51
4.3	Les AEEC et le quorum sensing.....	53
5.	Autres récepteurs et tropisme de l'intimine	55
5.1	Les intégrines	55
5.2	La nucléoline	57
5.3	Tropisme tissulaire et spécificité d'hôte.....	57
6.	Étude fonctionnelle des AEEC et réponse de l'hôte	58
6.1	Analyse protéomique.....	58
6.2	Analyses génétiques et transcriptionnelles.....	61
6.3	Cinétique d'expression des facteurs de virulence des EPEC <i>in vitro</i>	62
7.	Approches utilisées dans l'étude des mécanismes de virulence des AEEC	62
7.1	Les modèles d'étude <i>in vitro</i>	63
7.2	Les infections expérimentales <i>in vivo</i>	64
7.2.1	Volontaires humains.....	64
7.2.2	Le porc.....	65
7.2.3	Le lapin.....	66
7.2.4	Le veau	67
7.2.5	Le poulet.....	67
7.2.6	Le singe	68
8.	Les souches EPEC porcines (PEPEC).....	68
8.1	Les facteurs de virulence associés aux PEPEC	69
8.2	Les lésions A/E associées aux PEPEC <i>in vivo</i>	69
8.3	Les lésions A/E associées aux PEPEC en IVOC	70
8.4	L'adhérence des PEPEC.....	70
8.5	L'intimine des PEPEC.....	71
8.6	Le facteur Paa.....	72
9.	Les AEEC et le système immunitaire.....	73
9.1	Modulations immunitaires.....	73
9.1.1	Études <i>in vitro</i>	73

9.1.2	Études <i>in vivo</i>	75
9.2	Les stratégies thérapeutiques contre les AEEC	77
9.2.1	La vaccination	78
9.2.2	Les IgY comme alternative préventive et thérapeutique.....	79
10.	Immunologie du tractus gastro-intestinal porcin.....	82
10.1	Généralités.....	82
10.2	Les plaques de Peyer (PP).....	83
10.3	Les cellules M	84
10.4	L'épithélium associé aux follicules du GALT	85
10.5	La lamina propria	86
10.6	Les cytokines porcines et leurs rôles dans la protection de l'hôte	87
10.7	L'immunisation mucoale	88
10.7.1	Les cellules M comme cible potentielle pour la vaccination	89
MATÉRIEL ET MÉTHODES, ET RÉSULTATS.....		91
ARTICLE 1		92
Interaction of Enteropathogenic and Shiga-Toxin Producing <i>Escherichia coli</i> with Porcine Intestinal Mucosa: Role of Intimin and Tir in Adherence		
ARTICLE 2		134
Host Immune Status Influences the Development of Attaching and Effacing Lesions in Weaned Pigs		
ARTICLE 3		178
Use of Virulence Factor-Specific Egg Yolk-Derived Immunoglobulins as a Promising Alternative to Antibiotic Treatment for Control of Attaching and Effacing <i>Escherichia coli</i> Infections		
DISCUSSION		217
CONCLUSIONS.....		234
BIBLIOGRAPHIE		237
ANNEXES		297

ARTICLE 4	298
Characterization of the Novel Factor Paa Involved in the Early Steps of the Attaching and Effacing <i>Escherichia coli</i> Mechanism	
DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 1	339
DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 2	340
DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 3	346

LISTE DES TABLEAUX

ARTICLE 1

Table I. Bacterial strains and characteristics.	121
Table II. Primers used in this study.....	123
Table III. His-tagged fusion proteins used in this study	124

ARTICLE 2

Table I. His-tagged fusion proteins used in this study	165
Table II. Distribution of foci of intimately adherent bacteria in intestinal tissues from weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 following treatment or not with dexamethasone.	166

ARTICLE 3

Table I. Bacterial strains, and characteristics.	200
Table II. Primers and PCR products.....	201

ANNEXES

ARTICLE 4

Table I: Testing of the integrity of the <i>yciDE</i> region in <i>paa-positive</i> strains	328
Table II: Clinical and histopathological findings in piglets inoculated with porcine <i>E. coli</i> O45 isolates.	329

DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 2

Article 2, tableau complémentaire I: Prevalence of A/E lesions in PRRSV-negative and PRRSV-positive pigs challenged with PEPEC strains ECL1001 and ECL1015	341
---	-----

LISTE DES FIGURES

RECENSEMENT DE LA LITTÉRATURE

Figure 1. Résumé des effets pathologiques associés aux divers <i>E. coli</i> à tropisme intestinal.	13
Figure 2. Lésions d'attachement et d'effacement typiques induites par une souche EPEC porcine au niveau de l'iléon d'un porc sevré.....	15
Figure 3. Pathogénèse associée aux souches EPEC.	16
Figure 4. Représentation schématique des perturbations physiologiques induites par les EPEC au niveau de la cellule hôte.	23
Figure 5. Carte du locus LEE de la souche EPEC humaine E2348/69.	29
Figure 6. Cascades menant à la polymérisation de l'actine chez les EPEC _{O127} et les STEC _{O157} durant la formation des lésions A/E.....	33
Figure 7. Représentation schématique de l'appareillage du système de sécrétion de type III des EPEC et des STEC A/E+.	34
Figure 8. Classification fonctionnelle des protéines exprimées de façon différentielle (positive ou négative, suivant le ratio souche sauvage/mutant SSTT) <i>in vitro</i> lors d'une infection à EPEC.	60
Figure 9. Survol des différents éléments du GALT des mammifères.	82
Figure 10. Diagramme d'une cellule M au niveau des plaques de Peyer.....	84

ARTICLE 1

Figure 1. Adherence of various AEEC strains to the epithelial surface of porcine ileal segments..	112
Figure 2. Micrographs of HPS-stained sections of porcine ileal segment inoculated with the PEPEC strain ECL1001, or with the <i>eae</i> - mutant ICC170.....	113
Figure 3. Western blot analysis of whole-cell extracts and secreted proteins from culture supernatants probed with the anti-intimin, anti-EspA or anti-Tir antisera..	114

Figure 4. Intimin subtype influences the bacterial adherence and intestinal tropism of STEC and EPEC in porcine intestinal IVOC segments..	115
Figure 5. Human EPEC strain E2348/69 adheres to small intestinal epithelial cells and induces typical A/E lesions in porcine ileal IVOC segments.....	117
Figure 6. E2348/69 Δ <i>tir</i> mutant strain shows reduced adherence capacity to small intestinal epithelial cells on HPS-stained sections, although a loss of A/E capacity, but a close attachment with effacement of the brush border with no evidence of actin polymerization and pedestal formation on TEM and SEM sections.	118
Figure 7. For the <i>eae</i> - mutant strain CVD206, only a loose association of bacteria with no obvious change in associated epithelial cells was observed on HPS-stained sections, whereas bacteria closely associated to the brush border without effacement, or in the intestinal lumen, were observed on TEM. SEM sections show only rare, small foci of loosely associated bacteria, although areas of mucosa with elongated brush border microvilli could be seen, particularly around the periphery of bacterial microcolonies.....	119
Figure 8. Reduction of the mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with bacterial adherence per examined porcine ileal segment inoculated with mutant E2348/69 Δ <i>tir</i> or CVD206, following treatment with chicken anti-intimin antibodies.....	120

ARTICLE 2

Figure 1. Western blot analysis of whole-cell extract and secreted proteins from culture supernatants of the PEPEC strain ECL1001 using either rabbit or chicken polyclonal anti-intimin antisera, and chicken polyclonal anti-Tir antiserum, respectively.....	157
Figure 2. Dexamethasone significantly increases the bacterial colonization of O45-positive Nal ^r bacteria, and substantially increases the mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with intimately adherent bacteria in the ileum, cecum,	

and colon of pigs experimentally challenged with the PEPEC strain ECL1001.

..... 158

Figure 3. Representative HPS-stained ileal section of a DEX+/PEPEC+ pig, showing multiple foci of intimately adherent bacteria, and irregular enterocyte morphology. Further observation using rabbit anti-O45 and donkey anti-rabbit Rhodamine RedX conjugated antisera confirmed the presence of O45-positive bacteria in foci of intimately adherent bacteria. Multi-labeled IFA of an ileal section from a DEX+/PEPEC+ pig, stained with DAPI allowed detection of intimately adherent bacteria, together with red and green staining, corresponding to colocalised intimin and Tir proteins beneath intimately adherent bacteria, respectively..... 160

Figure 4. Representative TEM ileal tissue section of a DEX⁺/PEPEC⁺ pig showing extensive, typical A/E lesions with effacement of the microvilli, actin condensation beneath intimately adhered bacteria, and formation of cup-like pedestals. 162

Figure 5. PEPEC strain ECL1001 induces the upregulation of the mRNA levels of IL-6 and IL-8 in non-treated, challenged weaned pigs, as compared to non-treated, non-challenged pigs, in Peyer's patch-containing ileum segments. On the other hand, it induces the upregulation of the mRNA levels of IL-1 β and, to a lesser extent of IL-12p40, in DEX-/PEPEC+ pigs, as compared to DEX-/PEPEC-, and the downregulation of the mRNA levels of IL-6, in PP-lacking ileum segments. 163

ARTICLE 3

Figure 1. Virulence factor-specific chicken antisera recognize the corresponding protein in both homologous and heterologous AEEC strains on western blot..202

Figure 2. Intimin- and Tir-, but not EspA-, EspB-, and EspD-specific antibodies significantly reduced the mean percentage of ICME showing intimate adherence of homologous PEPEC strain ECL1001 in porcine ileal IVOC.....203

Figure 3. Intimin-, Tir-, and EspA-, but not EspB- or EspD-specific antibodies significantly reduced the mean percentage of ICME showing intimate adherence of heterologous AEEC strains, in porcine ileal IVOC.	204
Figure 4. Intimin- and Tir-, but not EspA-, EspB- or EspD-specific antibodies significantly reduced the mean percentage of ICME showing intimate adherence of human STEC _{O157:H7} strains 85-170 and STJ348, in porcine ileal IVOC.....	206
Figure 5. Oral administration of coated spray-dried egg powder containing anti-intimin antibodies resulted in a significantly lower mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with severe A/E lesions as compared to oral administration of coated spray-dried egg powder from non-immunized chickens or no treatment, in the small intestine of weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 NaI ^r ..	207

ANNEXES

ARTICLE 4

Figure 1. Light microscopy micrographs of ileal explants inoculated with the wild type O45 strain 86-1390 or with the LEE-negative strain 862.....	321
Figure 2. Adherence of wild-type strains and their <i>paa</i> - mutant strains.	322
Figure 3. Transmission electron micrographs of ileal explants inoculated with the wild type O45 strain 86-1390, the complemented mutant strain M155c or with <i>TnphoA</i> mutant M155..	323
Figure 4. The nucleotide and deduced amino acid sequences of <i>paa</i> and of its flanking sequences	324
Figure 5. Alignment of the deduced amino acid sequences between the Paa of the 86-1390 strain and the Paa protein of the O157:H7 EDL933 and Sakai <i>E. coli</i> strains, the AcfC protein of <i>Vibrio cholerae</i> and the PEB3 protein of <i>Campylobacter jejuni</i>	325
Figure 6. Reduction of the percentage of intact villi showing intimate adherence when pig ileal explants are inoculated with PEPEC strain 86-1390 following treatment with anti-Paa antibodies, compared to explants inoculated with strain	

86-1390 following treatment with antibodies from hens immunized with a sonicate preparation from host strain M15 (pREP4).....	326
Figure 7. Transmission electron micrographs showing the uniform distribution of immunogold-labelled Paa protein over the bacterial surface of the transcomplemented strain M155c following a 37°C overnight growth in TSB..	
.....	327

DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 1

Article 1, figure complémentaire 1. A complete <i>tir</i> deletion in human EPEC strain E2348/69 resulted in a significantly lower mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with bacterial adherence per examined explant in the duodenum, jejunum, and ileum, compared to the wild-type strain ex vivo..	339
--	-----

DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 2

Article 2, figure complémentaire 1. Colonization of nalidixic-acid resistant bacteria in the ileum, cecum and colon of PRRSV-positive and PRRSV-negative pigs experimentally challenged with the PEPEC strains ECL1001 and ECL1015. .	340
Article 2, figure complémentaire 2. Mean percentage of daily body weight gain of weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 following no treatment, or following treatment with dexamethasone at a daily dosage of 3 mg kg ⁻¹	342
Article 2, figure complémentaire 3. Average diarrhea score of weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 following no treatment, or following treatment with dexamethasone at a daily dosage of 3 mg kg ⁻¹	343
Article 2, figure complémentaire 4. Dexamethasone exerts significant reduction of the relative size of ileal Peyer's patches in weaned pigs.....	344
Article 2, figure complémentaire 5. Expression of IL-1 β in Peyer's patch-containing ileum segments.....	345

DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 3

Article 3, figure complémentaire 1. Western blot analysis of the His A/E virulence factor hybrid proteins using antibodies directed against RGS-His marker and the appropriate virulence factor.....	346
Article 3, figure complémentaire 2. Titer of the different antiserum raised in this study.	347
Article 3, figure complémentaire 3. Effect of serial dilution of anti-Intimin, anti-Tir, and anti-Paa antibodies on the mean percentage of ICME showing intimate adherence in porcine ileal IVOC segments inoculated with the PEPEC strain ECL1001.	348
Article 3, figure complémentaire 4. Neither anti-intimin antibodies, nor control antibodies inhibited the growth rate of the PEPEC strain ECL1001 NaI ^r as compared to growth of the strain in the absence of antibodies in culture conditions..	349

LISTE DES ABRÉVIATIONS

α	alpha
β	beta
δ	delta
ε	epsilon
γ	gamma
η	êta
λ	lambda
ν	nu
θ	thêta
ξ	xi
ζ	zêta
κ	kappa
ι	iota
μ	micro
A/E	lésions d'attachement et effacement
AAT	α_1 -antitrypsine
ADCC	cytotoxicité médiée par les anticorps
ADP	Adénosine diphosphate
AEEC	attaching and effacing <i>E. coli</i>
Afa	afimbrial adhesin
AIDA-1	adhesin involved in diffuse adhesion-I
APEC	Avian pathogenic <i>E. coli</i>
ATP	Adénosine triphosphate
BAPTA	bis[o-aminophenoxy]-ethane-N,N,N',N'-tetraaceticacid
BFP	Bundle-forming pilus
Ca^{2+}	calcium
$\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$	calcium intracellulaire

Ces	chaperone for <i>E. coli</i> secretion
CesD	chaperone for <i>E. coli</i> secretion D
CesT	chaperone for <i>E. coli</i> secretion of Tir
Cif	cycle inhibiting factor
Cl ⁻	chlore
CMH-2	complexe majeur d'histocompatibilité de type II
CNF1	cytotoxic necrotizing factor type 1
DAEC	Diffuse-adhering <i>E. coli</i>
DEPEC	Dog EPEC
DMEM	Dulbecco's modified Eagle medium
<i>eae</i>	<i>E. coli</i> attaching and effacing gene (codant pour l'intimine)
<i>eae</i> _{EPEC}	gène codant pour l'intimine des EPEC
<i>eae</i> _{STEC}	gène codant pour l'intimine des STEC
EAF	EPEC adherence factor
EAggEC	enteroaggregative <i>E. coli</i>
EAST1	EAggEC heat-stable enterotoxin 1
Efa1	<i>E. coli</i> factor for adherence
EIEC	enteroinvasive <i>E. coli</i>
EPEC	enteropathogenic <i>E. coli</i>
EPEC _{O127}	EPEC de sérotype O127
EspA	EPEC secretory protein A
EspB	EPEC secretory protein B
EspC	EPEC secretory protein C
EspD	EPEC secretory protein D
EspF	EPEC secretory protein F
EspF _U	homologue de EspF retrouvé sur le prophage cryptique CP _U
EspG	EPEC secretory protein G
EspH	EPEC secretory protein H
EspI	EPEC secretory protein I
EspJ	EPEC secretory protein J
ETEC	enterotoxigenic <i>E. coli</i>

ExPEC	extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i>
FAE	follicular-associated epithelium
FAS	fluorescent actin staining
GALT	gut-associated lymphoid tissues,
GPI	glycosylphosphatidylinositol
HIR	récepteur de l'hôte pour l'intimine
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IEL	lymphocytes intraépithéliaux
IFN- γ	interféron γ
IgA	immunoglobuline A
IgD	immunoglobuline D
IgE	immunoglobuline E
IgG	immunoglobuline G
IgM	Immunoglobuline M
IgY	immunoglobuline Y
Iha	Iron-regulated gene A (IrgA) homologue adhesin
IL	interleukine
iNOS	oxyde nitric synthase inductible
Int280	280 acides aminés de l'extrémité C-terminal
intimine _{O157}	intimine provenant d'une souche STEC _{O157:H7}
IP	inositol phosphate
Isc	short circuit current
IVOC	<i>in vitro</i> organ culture
Jak/Stat	Janus kinase-signal transducer and activator of transcription
kb	kilobase
kDa	kilodalton
LA	adhérence localisée
LEE	locus of enterocytes effacement
LEE _{EPEC}	LEE des EPEC
LEE _{STEC}	LEE des STEC
LifA	lymphocyte inhibition factor A

LPF	fimbriae longs polaires
LT	heat-labile enterotoxin
MALT	mucosal-associated lymphoide tissues
Map	mitochondrial associated protein
M-CSF	macrophage colony-stimulating factor
MEK/ERK	mitogen-activated protein kinase kinase-extracellular signal-regulated kinases
Mn ²⁺	manganèse
NF- $\kappa\beta$	facteur nucléaire $\kappa\beta$
NMR	résonance magnétique nucléaire multidimensionnelle
N-WASP	neural Wiskott-Aldrich syndrome protein
OMP	outer membrane protein
OmpA	outer membrane porin A
ORF	open reading frame
<i>paa</i>	porcine attaching and effacing associated gene
pb	paires de bases
PE	phosphatidylethanolamine
PEPEC	porcine EPEC
Per	plasmid encoded regulator
PKC	protéine kinase C
PLC γ	phospholipase C γ
PP	plaques de Peyer
REPEC	Rabbit EPEC
SDS-PAGE	sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis
Sep	secretion of EPEC proteins
SHU	haemolytic and uremic syndrome
sIgA	IgA sérétoires
SLT	Shiga-like toxins
SRRPv	virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin
SSTT	système de sécrétion de type III
STa	heat-stable enterotoxin a

STb	heat-stable enterotoxin b
STEC	Shiga toxin-producing <i>E. coli</i>
STEC A/E+	STEC produisant des lésions A/E
STEC _{O157:H7}	STEC de sérotype O157 :H7
Stx	toxines Shiga
TccP	Tir-cytoskeleton coupling protein
TER	transmembrane electrical resistance
TGF- β	transforming growth factor β
Th1	lymphocytes T helper 1
Tir	translocated intimin receptor
Tir _{EPEC}	Tir des EPEC
Tir _{STEC}	Tir des STEC
TNF- α	tumor necrosis factor α
UPEC	uropathogenic <i>E. coli</i>
VT	vérotoxines

À Chantal, ma source d'inspiration

REMERCIEMENTS

La réalisation d'un projet de recherche, quel qu'il soit, nécessite la collaboration et l'appuie de plusieurs personnes. J'ai eu la chance de pouvoir compter sur des gens extraordinaires.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr John M. Fairbrother, de m'avoir offert, en 1998, un emploi d'été au sein de son équipe et ensuite, en 1999, m'avoir accueilli dans son laboratoire en tant qu'étudiant à la maîtrise, puis au doctorat en 2001. Avec lui, j'ai appris la rigueur et l'exactitude scientifique, et ses conseils me seront toujours fort utiles.

Je tiens également à adresser des remerciements tout particuliers à :

Dr Mario Jacques, qui m'a fait l'honneur d'accepter la présidence de mon jury de thèse;

Drs Marcelo Gottschalk et Charles M. Dozois, pour avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse en tant que membre du jury et évaluateur externe, respectivement;

Dr Josée Harel, pour nos nombreuses discussions, ses encouragements, et ses précieux conseils;

Le Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies, le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada, le Programme de soutien aux initiatives internationales de recherche et d'innovation du Ministère du Développement économique et régional et de la Recherche du Québec, Gestion Univalor, le Fonds du Centenaire de la Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, et la Communauté Européenne (Quality of Life project) pour le support financier.

À cette liste, viennent s'ajouter plusieurs personnes dont l'aide, les conseils, ou leur seule présence m'ont aidé à cheminer tout au long de mes études aux cycles supérieurs. Je ne saurais toutes les nommer, mais je tiens particulièrement à remercier :

Les Drs Isabelle Batisson, Melha Mellata et Sylvie Pérès, mes amies, avec qui j'ai acquis mes premières armes en recherche ;

Les Drs Gad Frankel et Isabelle P. Oswald, pour leurs conseils et leur aide dans la réalisation de ce projet ;

Tous les membres et étudiants du GREMIP pour leur soutien, quel qu'il fût ;

Diane Montpetit (CRDA) pour m'avoir appris l'art de la microscopie électronique, ainsi que Guy Beauchamp (FMV) pour les nombreuses analyses statistiques ;

Tous les membres du laboratoire ECL, en particulier Brigitte Lehoux et Jade-Pascale Prévost Lemyre, pour l'aide apportée lors de nos nombreuses expériences *in vivo*. Vous avez contribué plus que vous le croyez à mes travaux, merci !

Finalement, je tiens à remercier ma famille, mes Minous et, en particulier, ma femme Chantal, sans qui tout ceci n'aurait été possible. Tu es une source inépuisable d'inspiration pour moi et ton soutien moral a souvent fait la différence. Je t'aime !

INTRODUCTION

Les *Escherichia coli* de type attachant et effaçant (AEEC), comprennent les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) et certains *E. coli* producteurs de toxines Shiga (STEC A/E+), dont ceux de sérotype O157:H7 (STEC_{O157:H7}). Ces souches sont responsables de désordres intestinaux, tant chez les enfants des pays en voie de développement (Nataro et Kaper 1998) et ceux des pays industrialisés, respectivement (Nataro et Kaper 1998), que chez diverses espèces animales telles le lapin (Cantey et Blake 1977), les veaux, le porc (Hélie *et al.* 1991), les agneaux et le chien (Janke *et al.* 1989). Les AEEC sont responsables du développement de lésions intestinales appelées lésions d'attachement et d'effacement (A/E), caractérisées par l'adhérence intime de la bactérie à la cellule épithéliale intestinale, l'effacement de la bordure en brosse, le réarrangement du cytosquelette de la cellule infectée, et la formation d'une structure en piédestal formée de diverses fibres du cytosquelette, dont l'actine. La plupart des éléments responsables du phénotype A/E sont contenus sur un îlot de pathogénicité appelé locus d'effacement des entérocytes (locus of enterocytes effacement, LEE). Ainsi, le LEE renferme un gène (*eae*) codant pour une protéine de la membrane externe appelée intimine, divers gènes codant pour un système de sécrétion de type III (*sep*), des chaperons (*ces*), et d'autres codant pour des protéines de translocation (*espA*, *espB*, *EspD*) ou effectrices (*espF*, *espG*, *map*). De plus, le LEE renferme un gène codant pour un récepteur transloqué de l'intimine (*tir*) et plusieurs cadres de lecture ouverts aux fonctions inconnues à ce jour. Bien que la caractérisation *in vitro* des différents facteurs de virulence des EPEC et STEC A/E+ progresse rapidement, la confirmation de leur rôle *in vivo* demeure limitée par les modèles disponibles.

Il existe principalement 5 sous-types d'intimine (α , β , δ , γ et ϵ), établis selon la variation antigénique des 280 acides aminés de leur domaine C-terminal (Adu-Bobie *et al.* 1998a; Oswald *et al.* 2000). L'intimine lie le récepteur Tir (Kenny *et al.* 1997b; Deibel *et al.* 1998; Hartland *et al.* 1999), mais celle-ci possède également la capacité de lier les cellules non-infectées, suggérant l'existence d'un récepteur de l'hôte pour l'intimine (HIR) (Frankel *et al.* 1994; McKee et O'Brien 1996; An *et al.* 1997; Hartland *et al.* 1999; Deibel *et al.* 2001). Divers candidats ont été proposés,

dont les intégrines $\beta 1$ pour l'intimine α de la souche EPEC humaine E2348/69 (Frankel *et al.* 1996), et la nucléoline pour les intimines de type α , β et γ (Sinclair et O'Brien 2002; Sinclair et O'Brien 2004). Le sous-type d'intimine influence le tropisme intestinal des EPEC et des STEC A/E+ et contribuerait à la spécificité d'hôte. Malgré l'accumulation d'évidences quant à l'existence et l'identité de récepteurs eucaryotes potentiels pour l'intimine, l'importance pathophysiologique de l'interaction intimine-HIR demeure inconnue.

Les AEEC sont aussi associés à des cas naturels de lésions A/E chez le porc sevré (Janke *et al.* 1989). Néanmoins, malgré le fait que les lésions A/E aient pu être reproduites expérimentalement chez le porcelet nouvellement-né infecté par des PEPEC (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1995b), ou des STEC_{O157:H7} (Tzipori *et al.* 1987; Donnenberg *et al.* 1993b; Dean-Nystrom *et al.* 2000), l'induction expérimentale de telles lésions chez le porc sevré s'est avérée infructueuse jusqu'à maintenant. Parmi les nombreuses différences physiologiques entre le porcelet nouvellement né et le porc sevré figure, entre autres, la présence d'un système immunitaire mature et fonctionnel.

Une augmentation croissante de la multirésistance aux agents antimicrobiens des isolats de *E. coli*, combinée à un nombre grandissant d'infections à EPEC et à STEC_{O157:H7} dans les pays en voie de développement et industrialisés, respectivement, fait pression sur la communauté scientifique afin de développer de nouvelles stratégies immunoprophylactiques et thérapeutiques face aux AEEC. L'immunisation passive, de même que la réduction de la colonisation des STEC A/E+ chez le bovin par le biais d'une vaccination à l'aide de protéines sécrétées par le système de sécrétion de type III (Potter *et al.* 2004), sont deux avenues envisagées dans le traitement et la prévention des infections à AEEC chez l'humain. Bien que l'approche vaccinale semble prometteuse, l'immunisation passive constitue une alternative envisageable afin de prévenir les infections à AEEC.

Le jaune d'œuf s'avère une source importante et peu onéreuse d'anticorps polyclonaux, dont les IgY. Ceux-ci ont été utilisés comme moyen préventif ou

thérapeutique contre un grand nombre de désordres d'origine bactérienne ou virale. Jusqu'à présent, aucune démonstration de l'efficacité des IgY à prévenir et/ou traiter les infections à AEEC n'a été initiée.

L'objectif général de cette étude était d'étudier la pathogenèse des infections à *Escherichia coli* de type attachant et effaçant chez le porc en utilisant la souche entéropathogène porcine (PEPEC) ECL1001 (originellement désignée P86-1390), de sérotype O45:H- (intimine β), de même que plusieurs souches de différents sérotypes et provenant de plusieurs espèces animales, y compris l'humain. Plus particulièrement, les objectifs de cette étude étaient:

1. d'optimiser un modèle d'IVOC intestinaux porcins provenant de porcelets nouvellement nés, lequel se rapproche des conditions d'infections *in vivo*, et d'y investiguer le rôle du sous-type d'intimine et du récepteur Tir dans l'adhérence des EPEC et des STEC A/E+ provenant de différentes espèces animales;
2. vérifier l'importance du statut immunitaire du porc sevré dans la résistance face à une infection expérimentale par les PEPEC, et d'investiguer la réponse cytokinaire pro-inflammatoire et son rôle dans la pathogenèse des PEPEC *in vivo*;
3. d'examiner la capacité d'anticorps IgY dirigés contre divers facteurs de virulence d'une souche PEPEC à réduire l'adhérence bactérienne intime menant à la formation de lésions A/E de plusieurs souches AEEC provenant de différentes espèces animales dans un modèle IVOC utilisant l'iléon de porcelets nouvellement nés, et *in vivo* chez le porc sevré (anti-intimine).

RECENSEMENT DE LA LITTÉRATURE

1. Les *Escherichia coli* pathogènes

1.1 Généralités

Escherichia coli a été décrit pour la première fois en 1885 par Theodore Escherich comme étant *Bacterium coli* commune (Escherich 1885). Ce micro-organisme fait maintenant partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (Holt *et al.* 1994). *E. coli* est un bacille à Gram négatif, anaérobie facultatif, mobile par des flagelles péricritiques, non-sporulant, chémo-organotrophe, fermenteur des sucres, produisant du gaz en glucose, réduisant les nitrates en nitrites, catalase positif et oxydase négatif (Holt *et al.* 1994).

E. coli est un habitant naturel du tractus intestinal de l'humain et des autres espèces animales mais est souvent associé à divers désordres intestinaux et extra-intestinaux (Sussman 1985; Fairbrother 1992; Orskov et Orskov 1992). Les premières classifications des souches de *E. coli* étaient basées sur le type antigénique du lipopolysaccharide (O), de la capsule (K) et des flagelles (H) (Orskov et Orskov 1984). On dénombre plus de 173 antigènes O, 80 antigènes K et 56 antigènes H (Orskov et Orskov 1992). Les *E. coli* peuvent provoquer des infections soit à partir de leur habitat naturel (tropisme intestinal), soit à partir des milieux qui en sont normalement exempts (tropisme extra-intestinal).

1.2 *E. coli* à tropisme extra-intestinal

Les *E. coli* pathogènes à tropisme extraintestinal (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) sont responsables d'infections extraintestinales dont la porte d'entrée se situe soit au niveau de l'intestin, soit au niveau d'autres sites divers (plaies, appareil respiratoire, etc.). Ces bactéries ont développé des stratégies leur permettant de

survivre et de se multiplier en milieux hostiles, pauvres en fer, et en présence des divers mécanismes de défense immunitaires de l'hôte. Les ExPEC sont principalement responsables d'infections urinaires (uropathogenic *E. coli* (UPEC) principalement responsable de cystites et de pyélonéphrites chez l'homme et d'autres espèces, dont le chien et le porc), de bactériémies et de septicémies chez l'homme et le porc, de méningites néo-natales pouvant entraîner la mort, de même que d'infections intra-abdominales et de pneumonies nosocomiales. Les ExPEC incluent aussi les *E. coli* pathogènes aviaires (avian pathogenic *E. coli*, APEC), responsables de cas de septicémie, de cellulite et d'aérosacculite chez la volaille (Mellata *et al.* 2003b; Mellata *et al.* 2003a). La majorité des ExPEC appartient à des groupes phylogéniques et à des sérogroupes O restreints (Johnson et Russo 2002). Les facteurs de virulence associés aux ExPEC sont, entre autres, les adhésines (P, S, FIC, Afa, Dr, fimbriae de Type 1), les toxines (hémolysine, CNF1), les sidérophores (aérobactine), les capsules (K1, K5, K12), les invasines, ainsi que divers facteurs contribuant à la résistance au sérum et aux phagocytes. Les gènes de virulence des ExPEC sont fréquemment retrouvés sur des îlots de pathogénicité (Blum *et al.* 1994; Groisman et Ochman 1996).

1.3 *E. coli* à tropisme intestinal

Les *E. coli* à tropisme intestinal sont classés en 6 pathotypes principaux (Smith 1992; Law 1994; Polotsky *et al.* 1994): les *E. coli* entérotoxigènes (enterotoxigenic *E. coli*, ETEC), les *E. coli* producteurs de toxines Shiga (Shiga toxin-producing *E. coli*, STEC), les *E. coli* entéropathogènes (enteropathogenic *E. coli*, EPEC), les *E. coli* entéroinvasifs (enteroinvasive *E. coli*, EIEC), les *E. coli* entéroagrégants (enteroaggregative *E. coli*, EAggEC), et les *E. coli* d'adhérence diffuse (diffuse-adhering *E. coli*, DAEC) (Fairbrother 1999). Les EPEC et certains STEC capable d'induire l'apparition de lésions d'attachement et d'effacement (A/E) (STEC A/E+), sont aussi appelée *E. coli* attachants et effaçants (AEEC) (Nataro et

Kaper 1998). Les effets pathogéniques des divers pathotypes de *E. coli* à tropisme intestinal sont schématisés à la figure 1, et les prochaines sections seront consacrées à résumer les principaux mécanismes de virulence de chacun des pathotypes énumérés.

1.3.1 Les ETEC

Les ETEC sont responsables de désordres intestinaux chez l'humain (Nataro et Kaper 1998), et d'autres espèces animales, en particulier le veau et le mouton (diarrhée néonatale), le porc (diarrhée néonatale et postsevrage, maladie de l'œdème en combinaison avec des STEC), et le chien (diarrhée) (Gyles et Fairbrother 2004). Le mécanisme d'induction de la diarrhée par les ETEC est très bien connu aujourd'hui. Les ETEC possèdent des adhésines fimbriaires telles F4 (K88), F5 (K99), F6 (987P) et F41 (Nataro et Kaper 1998; Gyles et Fairbrother 2004), leur permettant d'adhérer à la muqueuse intestinale et ainsi, produire une ou plusieurs entérotoxines, soit la toxine thermolabile LT (heat-labile enterotoxin), soit les toxines thermostables STa et/ou STb (heat-stable enterotoxin) (Gyles 1992; Hacker 1992; Dubreuil 1999). Ces toxines stimulent la sécrétion de fluide intestinal et amènent ainsi l'apparition de diarrhée (Gyles 1992; Hacker 1992; Dubreuil 1999). Les ETEC demeurent à une certaine distance de la cellule hôte et n'induisent pas de changement morphologique (Fairbrother 1992). Les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections à ETEC sont O6, O8, O11, O15, O20, O25, O27, O78, O128, O148, O149, O159, O173 chez l'humain (Nataro et Kaper 1998), O8, O9, O20, O64 et O101 chez les ruminants, et O8, O9, O20, O45, O64, O101, O138, O139, O141, O147, O149, O157 chez le porc (Gyles et Fairbrother 2004).

1.3.2 Les EPEC

L'adhérence des EPEC à la cellule hôte constitue la première étape d'un processus multifactoriel menant aux lésions A/E (Donnenberg *et al.* 1997b; Nougayrède *et al.* 1999). Selon un criblage génétique de souches EPEC utilisant la variation de séquence des gènes d'entretien (housekeeping genes), il a été possible de différencier 2 groupes d'EPEC, soit les EPEC de clone 1 et les EPEC de clone 2 (Frankel *et al.* 1998a). Les EPEC de clone 1 expriment typiquement l'antigène flagellaire H6, tandis que les EPEC de clone 2 expriment l'antigène H2 et sont non-motiles (Frankel *et al.* 1998a). Dans ces groupes, le sérotype O varie tandis que l'antigène H est constant et bien conservé (Frankel *et al.* 1998a).

L'efficacité des EPEC repose sur leur capacité à adhérer intimement aux cellules hôtes, à causer l'effacement des microvillosités et à induire une réorganisation du cytosquelette sous le site de liaison, résultant en l'apparition des lésions A/E (Frankel *et al.* 1998a; Neves *et al.* 1998). Les EPEC sont aussi responsables de désordres intestinaux chez d'autres espèces animales, en particulier chez le porc (porcine EPEC, PEPEC), le lapin (rabbit EPEC, REPEC), le chien (dog EPEC, DEPEC), les bovins, les agneaux, les chevaux, les chats (Moxley et Francis 1986; Pospischil *et al.* 1987; Sherman *et al.* 1988; Janke *et al.* 1989; An *et al.* 1999b) et les singes (Carvalho *et al.* 2003). Les différents facteurs de virulence associés aux EPEC et menant au développement des lésions A/E sont véhiculés sur un îlot de pathogénicité appelé « locus d'effacement des entérocytes » ou LEE (McDaniel *et al.* 1995). Différents gènes sont impliqués dans la pathogenèse des infections à EPEC, soit des adhésines (BFP, EspA, intimine), un récepteur bactérien pour l'intimine (Tir), ainsi que différentes protéines (EspB, EspD) transloquées par un système de sécrétion de type III (SSTT). Une revue complète des différents facteurs de virulence associés aux EPEC sera réalisée plus loin. Les principaux sérotypes impliqués dans les cas d'infections à EPEC sont O55, O86, O111, O119, O125ac, O126, O127, O128, O142 chez l'humain (Nataro et Kaper 1998), O45 et O103 dans les cas de diarrhée postsevrage chez le porc, O2, O8, O15, O20, O25, O103, O109, O128 et O132 chez

le lapin, et O45, O49, O115, O118 et O119 chez le chien (Beutin 1999; Gyles et Fairbrother 2004).

1.3.3 Les STEC

Les STEC sont connus comme agents pathogènes chez l'humain depuis 1982 et ont été isolés pour la première fois aux États-Unis (O'Brien *et al.* 1983). Les STEC sont caractérisées par leur capacité à produire une ou plusieurs toxines Shiga (Stx, anciennement appelées vérotoxines (VT), ou Shiga-like toxins (SLT)). Certaines souches STEC, dont font partie les *E. coli* de sérotype O157:H7 (STEC_{O157:H7}), ont la capacité d'induire des lésions A/E (STEC A/E+) en adhérant intimement à la paroi intestinale (Ebel *et al.* 1998b), comme le font les EPEC. Les gènes nécessaires à l'induction des lésions A/E sont aussi contenus sur le LEE et sont, pour la plupart, homologues à ceux retrouvés chez les EPEC. Outre chez l'humain, les STEC sont aussi responsables de désordres intestinaux chez le veau (Dean-Nystrom *et al.* 2003), et sont associés à la maladie de l'œdème chez le porc, conjointement avec les ETEC (Gyles et Fairbrother 2004). Les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections à STEC sont O26, O55, O111ab, O113, O117 et O157 chez l'humain (Nataro et Kaper 1998), O138, O139 et O141 chez le porc lors de cas de maladie de l'œdème, et O5, O8, O20, O26, O103, O111, O118 et O145 dans les cas de dysenterie chez le bovin et le mouton (Gyles et Fairbrother 2004).

De façon générale, les STEC causent des gastro-entérites et des colites hémorragiques, mais peuvent également causer des problèmes rénaux et neurologiques sévères, voire même mortels, comme dans le cas du syndrome urémique hémolytique (SHU) (Frankel *et al.* 1998a), et ce malgré l'absence de lésions A/E (Doughty *et al.* 2002). Ces complications systémiques sont dues à la libération de toxines Shiga (Stx1 et/ou Stx2) au niveau de l'intestin (Frankel *et al.* 1998a). Les STEC peuvent être séparés en 2 groupes génétiques, soit le groupe 1 et le groupe 2 (Frankel *et al.* 1998a). Les STEC du groupe 1 incluent les souches de

sérotype O157:H7, tandis que le groupe 2 renferme d'autres souches Stx-positives, incluant les sérotypes O26 et O111 (Frankel *et al.* 1998a). Les STEC du groupe 2 ressemblent beaucoup aux souches EPEC typiques, alors que les souches de sérotype O157:H7 ressemblent plus à la souche EPEC atypique O55:H7 (Frankel *et al.* 1998a; Kaper *et al.* 1998).

1.3.4 Les EIEC

Les EIEC sont responsables d'une diarrhée dysentérique invasive chez l'humain (Levine 1987), et leur implication dans des cas cliniques chez d'autres espèces animales n'a pas été signalée jusqu'à présent (Beutin 1999; DebRoy et Maddox 2001). Les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections à EIEC chez l'humain sont O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O152, O164 et O167 (Nataro et Kaper 1998). Cliniquement, les infections à EIEC se caractérisent par une hyperthermie, de sévères crampes abdominales, ainsi que par une diarrhée aqueuse profuse avec présence de sang et de mucus (Levine 1987). Les EIEC possèdent divers facteurs de virulence, dont des invasines et des entérotoxines (Nataro et Kaper 1998). Le pouvoir invasif des EIEC peut être démontré par un test de Serény positif, i.e. l'induction d'une kératoconjonctivite chez le cochon d'Inde (Zhu 1996), ou *in vitro* sur cellules HeLa (Nataro et Kaper 1998).

1.3.5 Les EAggEC

Les souches EAggEC sont fréquemment associées à des diarrhées infantiles persistantes (plus de 15 jours) dans les pays en voie de développement (Cravioto *et al.* 1991), et leur implication dans des cas cliniques chez d'autres espèces animales n'a pas été signalée jusqu'à présent (Beutin 1999; DebRoy et Maddox 2001). *In vitro*,

ces souches s'agrègent aux cellules HEP-2 et aux cellules épithéliales de la muqueuse du côlon humain mais n'adhèrent pas *in vitro* aux cellules de la muqueuse duodénale humaine (Nataro et Kaper 1998). *In vivo*, les EAggEC adhèrent aux cellules épithéliales de la muqueuse intestinale de porcelets axéniques (Nataro et Kaper 1998). Plusieurs facteurs sont impliqués dans la pathogenèse des infections à EAggEC, entre autre une toxine thermostable (EAST1) (Ménard et Dubreuil 2002) et le pilus AAF/1 (Nataro et Kaper 1998). Les principaux sérogroupes impliqués dans les cas d'infections à EaggEC chez l'humain sont O3, O15, O44, O77, O86, O111 et O127 (Nataro et Kaper 1998).

1.3.6 Les DAEC

Les DAEC représentent la classe de *E. coli* la moins bien connue parmi celles amenant des désordres intestinaux chez l'humain (Girón *et al.* 1991; Jallat *et al.* 1993; Jallat *et al.* 1994; Beinke *et al.* 1998). Ces souches sont principalement caractérisées par leur capacité à adhérer *in vitro* d'une façon diffuse aux cellules HeLa et HEP-2 (Beinke *et al.* 1998). Les DAEC constituent un groupe hétérogène contenant à la fois des souches pathogènes et non-pathogènes (Girón *et al.* 1991; Jallat *et al.* 1993; Jallat *et al.* 1994; Beinke *et al.* 1998). À ce jour, quatre adhésines associées au DAEC ont été identifiées : AIDA-I, F1845, CF16K et une protéine de 57 kDa (Beinke *et al.* 1998). Les souches DAEC sécrètent des protéines homologues à celles du système de gènes *esp* des EPEC et semblent capables d'induire un phénotype rappelant celui des souches produisant des lésions A/E. Ce dernier est caractérisé par une adhérence diffuse à la muqueuse intestinale, l'accumulation d'actine et de protéines phosphorylées au site d'attachement, et l'élongation des microvillosités, enrobant les bactéries (Beinke *et al.* 1998). L'invasion des cellules intestinales par les DAEC n'a jamais été rapportée (Nataro et Kaper 1998). Récemment, des souches AIDA-1-positives ont été isolées de cas de diarrhée chez le porc (Ngeleka 2002). Jusqu'à

présent, seul le sérotype O126 a été associé aux DAEC chez l'humain (Nataro et Kaper 1998).

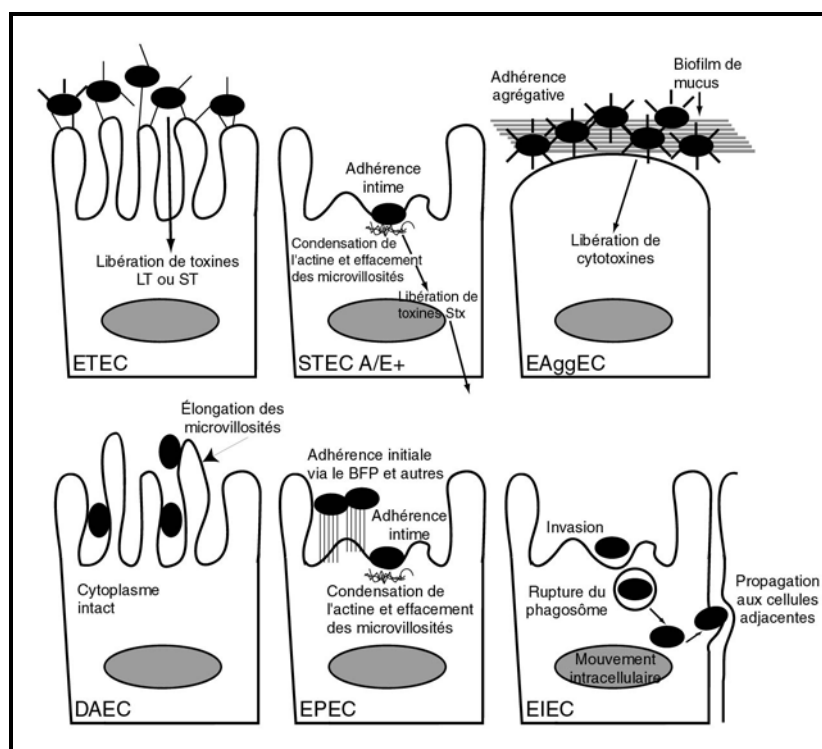


Figure 1. Résumé des effets pathologiques associés aux divers *E. coli* à tropisme intestinal. Adapté de Nataro et Kaper, 1998 (Nataro et Kaper 1998).

2. Les *Escherichia coli* attachants et effaçants

Les EPEC et les STEC A/E+, dont font partie les STEC de sérotype O157:H7 (STEC_{O157:H7}), sont aussi appelés « *E. coli* attachants et effaçants », ou AEEC (attaching and effacing *E. coli*), car ils ont la capacité d'induire des lésions A/E au niveau de l'intestin (Levine 1987). Les STEC A/E+ se distinguent des EPEC par le fait qu'ils produisent une ou plusieurs toxines Shiga, en association avec une diarrhée hémorragique, souvent accompagnée du SHU (Donnenberg et Kaper 1992). Aujourd'hui, on dénote la présence de souches produisant des lésions A/E, entre autre, chez le porc (porcine EPEC, PEPEC), le lapin (rabbit EPEC, REPEC), le chien (dog

EPEC, DEPEC), les bovins, les agneaux, les chevaux, les chats (Moxley et Francis 1986; Pospischil *et al.* 1987; Sherman *et al.* 1988; Janke *et al.* 1989; An *et al.* 1999b) et les singes (Carvalho *et al.* 2003).

2.1 Les lésions d'attachement et d'effacement

Les lésions A/E ont été observées pour la première fois en 1969 chez des porcelets nouveau-nés (Staley *et al.* 1969). Elles se caractérisent principalement par l'attachement initial de la bactérie à la muqueuse intestinale, l'adhérence intime (<10 nm) des bactéries à l'épithélium intestinal, l'effacement des microvillosités ou bordure en brosse, la réorganisation du cytosquelette cellulaire avec la condensation de l'actine et la formation d'une structure en piédestal du côté apical de la cellule intestinale (Figure 2) (Knutton *et al.* 1989; Drolet *et al.* 1994; Knutton 1994; Law 1994; Ebel *et al.* 1998a; An *et al.* 1999b).

Chez l'humain, les lésions A/E causées par les EPEC et les STEC A/E+ sont surtout retrouvées chez les enfants des pays en voie de développement et dans les pays industrialisés, respectivement (Nataro et Kaper 1998), alors que chez le porc, elles surviennent surtout durant la période post-sevrage. Les EPEC induisent principalement des lésions A/E au niveau du petit intestin (Nataro et Kaper 1998), alors les souches PEPEC induisent des lésions A/E se localisant surtout dans la partie distale de l'intestin grêle et au niveau du côlon (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1994; Higgins *et al.* 1997). Pour leur part, les STEC A/E+ sont surtout associées à l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer (PP) chez l'humain (Phillips *et al.* 2000b).

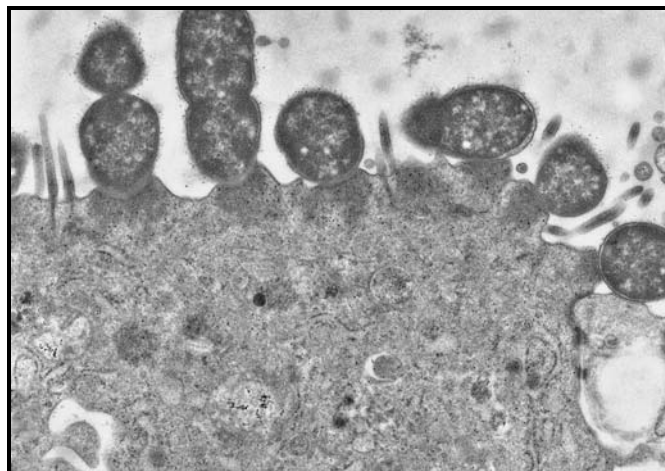


Figure 2. Lésions d’attachement et d’effacement typiques induites par une souche EPEC porcine au niveau de l’iléon d’un porc sevré (10500x) (Francis Girard, Laboratoire *Escherichia coli*, EcL).

Les lésions A/E s'accompagnent souvent de sites inflammatoires au niveau de la *lamina propria* et d’une infiltration de neutrophiles (Cantey et Blake 1977). La formation des lésions A/E est aussi associée à la transmission de plusieurs signaux de transduction dans la cellule hôte incluant l’activation de la phospholipase C, l’induction du facteur nucléaire NF- κ B et le relargage d’interleukine 8 (Frankel *et al.* 1998a; Kaper *et al.* 1998; Nataro et Kaper 1998; Elliott *et al.* 1999a). Les différentes voies de signalisation intracellulaires, ainsi que la réponse immunitaire induite par les EPEC seront traitées ultérieurement dans des chapitres distincts.

2.2 Le modèle d’infection des EPEC

Un modèle a récemment été proposé afin de décrire le développement des lésions A/E induites par les EPEC (DeVinney *et al.* 1999a). L’adhérence initiale (Figure 3a) des micro-organismes à la cellule épithéliale intestinale est caractérisée

par la formation de micro-colonies à la surface de la cellule épithéliale et fait suite à l'expression du BFP (Bundle-forming pilus), et EspA (Figure 3b) (DeVinney *et al.* 1999a). Cette adhérence stimule la translocation de EspB et Tir dans la membrane de la cellule hôte (Hicks *et al.* 1998; Knutton *et al.* 1998), via le filament EspA (Knutton *et al.* 1998). Ensuite, les gènes chromosomiques bactériens *x* et *y* envoient un signal de transduction à la cellule épithéliale intestinale, entraînant une augmentation de l'activité tyrosine kinase (Rosenshine *et al.* 1992b) et l'augmentation du calcium intracellulaire ($\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$) (Baldwin *et al.* 1991), provoquant l'insertion du récepteur dans la membrane eucaryote, le réarrangement de l'actine cellulaire et l'effacement des microvillosités (Figure 3c) (Hicks *et al.* 1998; Knutton *et al.* 1998). Par la suite, l'intimine, codée par le gène *eae* du locus LEE, permet l'attachement intime des bactéries à la cellule épithéliale (Figure 3c) (Hicks *et al.* 1998; Knutton *et al.* 1998). Ceci amène l'accumulation de composantes du cytosquelette au site d'attachement, la prolifération de l'actine et la formation d'une structure en piédestal (Figure 3c) (Knutton *et al.* 1989; Finlay *et al.* 1992; DeVinney *et al.* 1999a).

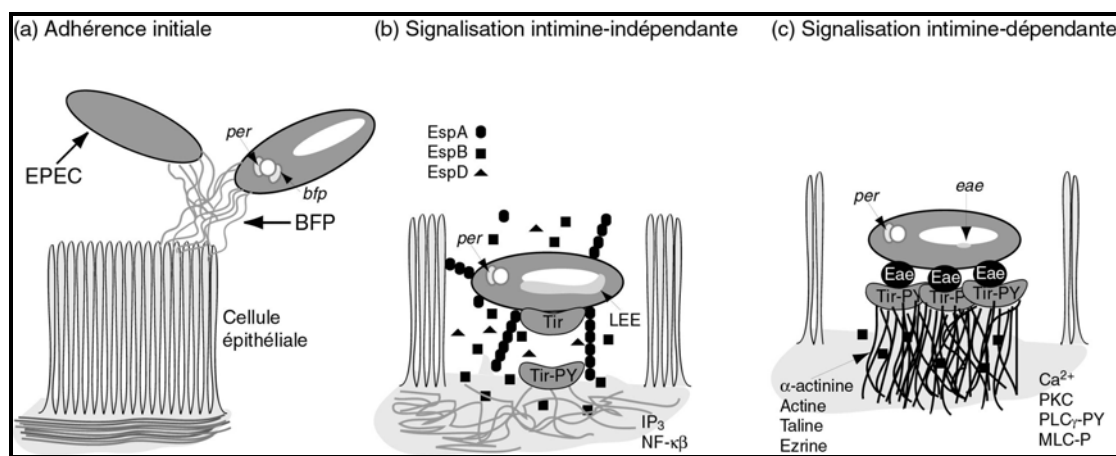


Figure 3. Pathogenèse associée aux souches EPEC. Adapté de DeVinney *et al.*, 1999 (DeVinney *et al.* 1999a).

2.3 L'adhérence localisée (LA)

L'adhérence localisée (LA) est caractérisée par l'adhérence d'amas bactériens circonscrit en moins de trois heures lors d'utilisation de cultures cellulaires inoculées avec une souche EPEC (Cravioto *et al.* 1979; Nataro *et al.* 1985; Nataro *et al.* 1987; Tobe *et al.* 1999). L'adhérence localisée de la souche EPEC humaine E2348/69 (O127:H6) aux cellules épithéliales intestinales dépend de la présence d'un plasmide de 60 MDa, le « EPEC adherence factor » ou EAF (Nataro et Kaper 1998). Le transfert du EAF à la souche non-adhérente HB101 est suffisant afin d'induire l'adhérence localisée aux cellules HEP-2 *in vitro* (Nataro et Kaper 1998). Il est bien connu aujourd'hui que le « bundle-forming pilus » (BFP) est l'adhésine fimbriaire de type IV permettant le phénotype LA, dont le système de gènes (voir section *bfp*) est localisé sur le plasmide EAF (Nataro et Kaper 1998). Le BFP est directement impliqué dans l'adhérence bactérie-bactérie et bactérie-cellule hôte (Nataro et Kaper 1998; Donnenberg 1999), et il semble que ce dernier interagisse avec le phosphatidyléthanolamine (PE) (Nougayrede *et al.* 2003). Ces observations ont récemment été appuyées par l'absence d'adhérence des EPEC via le BFP aux globules rouges, n'exprimant pas le PE à leur surface (Shaw *et al.* 2002).

2.4 Les réarrangements du cytosquelette cellulaire

L'adhérence intime des bactéries à la muqueuse intestinale est associée à un remaniement du cytosquelette et à l'augmentation du calcium intracellulaire, amenant une restructuration du pôle apical de la cellule hôte. Malgré tout, l'importance de ce remaniement est encore mal connue. Cette réorganisation cellulaire amène la formation d'une structure en piédestal, principalement formée d'actine polymérisée, d' α -actinine, d'ezrine, de taline et de myosine (Knutton *et al.* 1998).

Une accumulation Tir-indépendante du complexe d'annexine-2/protéine S100A10 sous la bactérie adhérente a aussi été identifiée chez les EPEC. EspB et/ou EspD pourraient servir d'ancrage pour ce complexe protéique (Zobiack *et al.* 2002). L'annexine-2 possède trois sites de liaison au Ca^{2+} et interagit avec les phospholipides acides retrouvés du côté cytoplasmique de la membrane cellulaire ou des membranes des endosomes (Gerke et Moss 1997). Elle peut aussi lier le cytosquelette d'actine dans une interaction calcium (Ca^{2+})-dépendante (Filipenko et Waisman 2001). L'annexine-2 existe sous forme monomérique mais est majoritairement retrouvée en complexe hétérotétramérique avec la protéine S100A10 qui se lie au domaine N-terminal de l'annexine (Zobiack *et al.* 2002). Aussi, on remarque une accumulation de cholestérol et de protéines ancrées au glycosylphosphatidylinositol (GPI) sous la bactérie adhérente. Ces microdomaines concentrés en cholestérol et protéines associées au GPI sont appelés « rafts ». Ceci indique que l'attachement des EPEC induit une agglomération des "rafts" ainsi qu'un recrutement d'annexine-2/S100A10 qui pourrait faire le lien entre le "raft" et le cytosquelette d'actine, de façon Tir-indépendante (Zobiack *et al.* 2002).

2.5 L'adhérence intime

L'adhérence intime constitue la caractéristique principale du mode d'infection des AEEC (Frankel *et al.* 1998a). Les gènes directement impliqués dans l'adhérence intime, soit *eae* et *tir*, se situent en amont des gènes *esp* sur le LEE (Frankel *et al.* 1998a). Le produit du gène *eae* des EPEC, l'intimine, est semblable aux invasines impliquées dans l'invasion des cellules eucaryotes par *Yersinia sp.* (Frankel *et al.* 1998a). Tout comme les invasines, la capacité d'adhérence de l'intimine des EPEC est donnée par les 280 acides aminés de l'extrémité C-terminale (Int280) (Frankel *et al.* 1994) et par une boucle de 76 acides aminés logeant à l'intérieur des 280 acides aminés et formant des ponts disulfures entre deux cystéines en position 862 et 937 (Kelly *et al.* 1998). Cette boucle est nécessaire à la liaison intimine-récepteur menant

à l'adhérence intime dans les cellules en cultures (Kelly *et al.* 1998). Durant la formation des lésions A/E, certaines molécules d'intimine se lient avec le récepteur Tir et, ensemble, forment l'adhérence intime irréversible (Frankel *et al.* 1998a). Lors d'infection de cellules de mammifères en culture, les molécules d'intimine demeurant libres subissent un processus de régulation négative et disparaissent au fur et à mesure que les lésions A/E apparaissent (Knutton *et al.* 1997). Par contre, ce processus de régulation négative n'est pas observé lors d'infection de cellules épithéliales fixes, suggérant que les EPEC aient la capacité de répondre aux changements cellulaires (Knutton *et al.* 1997). La nature des signaux envoyés par la cellule infectée aux bactéries est encore inconnue (Knutton *et al.* 1997).

Il existe quatorze sous-types d'intimine associés aux AEEC (alpha1, $\alpha 1$, $\alpha 2$, beta, β , gamma, γ , kappa, κ , epsilon, ϵ , éta, η , iota, ι , lambda, λ , thêta, θ , zêta, ζ , micro, μ , nu, ν , et xi, ξ) (Ramachandran *et al.* 2003), les principaux étant $\alpha 1$, β , γ , δ et ϵ (Adu-Bobie *et al.* 1998a; Oswald *et al.* 2000). Chez l'humain, l'intimine α est exprimée principalement par les souches EPEC appartenant au groupe clone 1, tandis que l'intimine β est associée aux EPEC et STEC du groupe clone 2 respectivement (Adu-Bobie *et al.* 1998a). L'intimine γ est associée aux souches STEC_{O157:H7} et O55:NM, tandis que l'intimine δ est exprimée seulement par la souche EPEC O86:H34 (Adu-Bobie *et al.* 1998a). Les souches STEC humaines, ovines et bovines expriment principalement les intimines β , ζ , θ , γ et ϵ (Ramachandran *et al.* 2003), alors que l'intimine β prédomine chez le porc et le lapin (Zhu 1996; Marches *et al.* 2000; Ramirez *et al.* 2005). Il existerait une corrélation entre le type d'intimine, le site d'insertion du locus LEE et le groupe d'EPEC ou STEC (Adu-Bobie *et al.* 1998a).

2.6 L'invasion de la cellule hôte

Plusieurs études relatent la capacité qu'ont les EPEC d'envahir les cellules en culture et les cellules épithéliales adjacentes au site de formation des lésions A/E *in vitro* et *in vivo*, tant chez l'animal que chez l'humain (Staley *et al.* 1969; Moon *et al.* 1983; Knutton *et al.* 1987b; Donnenberg *et al.* 1989; Donnenberg *et al.* 1990c; Donnenberg et Kaper 1992). Néanmoins, l'invasion par les EPEC demeure relativement faible et très peu de données sont disponibles quant aux mécanismes impliqués et à son importance clinique.

L'invasion des cellules par les EPEC est inhibée par la cytochalasine et la colchicine (Donnenberg *et al.* 1990a), dépend d'un SSTT fonctionnel (Donnenberg *et al.* 1990c; Rosenshine *et al.* 1992a), est grandement diminuée en absence de l'intimine (Donnenberg *et al.* 1989; Francis *et al.* 1991; Rosenshine *et al.* 1992a; Frankel *et al.* 1998b), et est inhibée par l'emploi d'inhibiteurs à large spectre des GTPases Rho (Ben-Ami *et al.* 1998). La capacité de l'intimine purifiée à amener la formation de pseudopodes à la surface de la cellule hôte (Phillips *et al.* 2000a) laisse croire que l'intimine peut initialiser la signalisation menant à l'invasion, et ce de façon Tir-indépendante. De plus, considérant que des GTPases Rho tel Cdc42 sont impliquées dans l'invasion chez plusieurs pathogènes (Ben-Ami *et al.* 1998; Hardt *et al.* 1998; Stender *et al.* 2000; Martinez et Hultgren 2002), il est possible que la protéine Map, traitée en détails ultérieurement dans la thèse, soit impliquée dans l'invasion de la cellule hôte par les EPEC, puisque celle-ci a la capacité d'induire des pseudopodes Cdc42-dépendants *in vitro* (Kenny *et al.* 2002). Cette hypothèse a récemment été vérifiée (Jepson *et al.* 2003) et l'implication de Tir et Map dans l'invasion de la souche EPEC humaine E2348/69 a été étudiée. En résumé, la surexpression plasmidique de Map, qui stimule la formation de pseudopodes de façon Cdc42-dépendante, augmente grandement le pouvoir invasif de la souche EPEC, comparativement à la souche sauvage, et ne nécessite pas la translocation de Map dans les mitochondries. Une délétion chromosomique de *tir* diminue le pouvoir invasif de la souche EPEC, mais sa surexpression plasmidique ne semble pas

influencer l'invasion. L'implication de l'intimine et de Tir dans l'invasion a été confirmée, mais leur présence simultanée n'est ni essentielle, ni suffisante (Jepson *et al.* 2003). Finalement, l'expression plasmidique de Map et Tir de façon individuelle dans un double mutant $\Delta map \ tir$ a partiellement restaurée le pouvoir invasif de la souche, démontrant que Map et Tir peuvent interagir de façon indépendante l'une de l'autre.

2.7 L'induction de la diarrhée par les AEEC

Les mécanismes exacts d'induction de la diarrhée par les AEEC sont encore peu connus mais différent de ceux des ETEC et des EIEC (Levine 1987; Donnenberg et Kaper 1992). Les études réalisées jusqu'à présent ont permis d'émettre des hypothèses quant aux éléments impliqués. Un mécanisme probable est la sécrétion exagérée d'ions Cl^- (Finlay et Falkow 1997; Hecht et Koutsouris 1999; Hecht *et al.* 1999). D'autres études ont démontré qu'une infection à EPEC amène la dépolarisation de la membrane de la cellule hôte, possiblement due à des changements dans le transport d'électrolytes cellulaires (Stein *et al.* 1996). Par la suite, Collington *et al.* (Collington *et al.* 1998b) ont démontré qu'une infection à EPEC augmente le courant électrique intracellulaire (short circuit current, I_{sc}) des cellules épithéliales en culture, et que cette augmentation est due, en partie, à la sécrétion d'ions Cl^- .

Les EPEC ont aussi la capacité de diminuer la résistance électrique transépithéliale (transmembrane electrical resistance, TER) en monocouches polarisées (Canil *et al.* 1993). Cette diminution est principalement due à la rupture des jonctions serrées des cellules épithéliales, reliant les cellules épithéliales adjacentes entre elles et gouvernant le passage de l'eau, de différentes molécules ainsi que des cellules du système immunitaire, elle-même causée par la phosphorylation de la chaîne légère de la myosine par les EPEC (Yuhan *et al.* 1997). Dean et Kenny

(Dean et Kenny 2004) ont démontré que la présence de l'intimine est cruciale afin de permettre aux protéines effectrices Map et EspF de perturber les fonctions de la barrière intestinale. De plus, cette fonction est complètement indépendante du récepteur Tir, révélant du même coup une fonction probable de l'interaction de l'intimine avec un récepteur de l'hôte pour l'intimine (host intimin receptor, HIR).

Récemment, il a été démontré que l'altération précoce des jonctions serrées par les EPEC est dépendante de la présence du récepteur Tir, mais que la rupture tardive de la polarité cellulaire dépend de la liaison de l'intimine et des intégrines $\beta 1$ (Figure 4) (Muza-Moons *et al.* 2003). De plus, le facteur EspF est requis pour obtenir un effet maximal sur les jonctions serrées (McNamara *et al.* 2001). Normalement, les intégrines $\beta 1$ et les pompes ATPase Na^+/K^+ sont retrouvées uniquement au niveau de la membrane basolatérale des cellules polarisées. Lors d'une infection par les EPEC, les pompes ATPase Na^+/K^+ , de même que les intégrines $\beta 1$, migrent vers le pôle apical de la cellule.

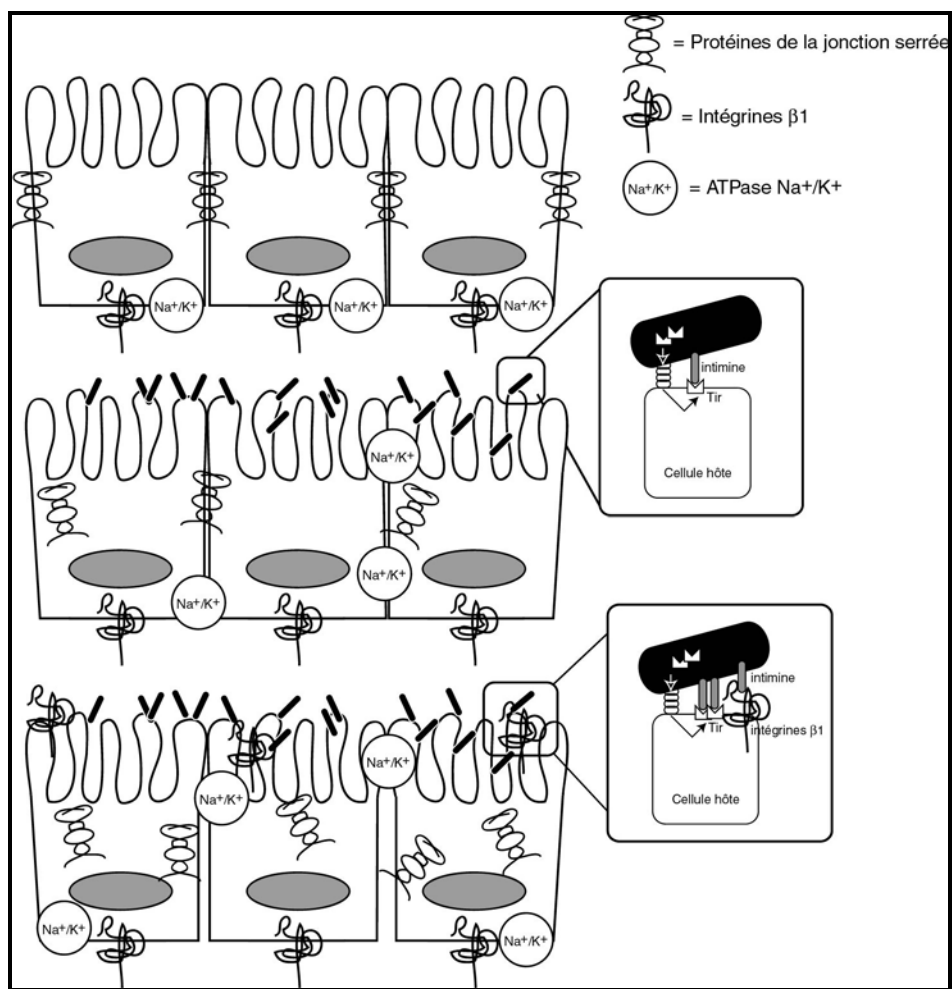


Figure 4. Représentation schématique des perturbations physiologiques induites par les EPEC au niveau de la cellule hôte. Adapté de Muza-Moons *et al.*, 2003 (Muza-Moons *et al.* 2003).

Cette altération fonctionnelle de la barrière épithéliale, caractérisée par la rupture des gradients électrochimiques et l'augmentation de la perméabilité intestinale, pourrait contribuer à l'apparition de la diarrhée induite par les EPEC.

À ces perturbations cellulaires s'ajoutent la perte des microvillosités, entraînant une malabsorption et par conséquent, des troubles osmotiques importants, et la présence d'inflammation associée à la sécrétion localisée de certaines cytokines, entraînant une hypersécrétion du fluide intestinal et la diarrhée. Pour terminer, la sécrétion de l'entérotoxine EspC jouerait un rôle accessoire dans la pathogenèse des

infections dues à certains isolats EPEC (Mellies *et al.* 2001) mais son implication directe dans l'induction de la diarrhée n'a pas été démontrée jusqu'à présent.

2.8 La signalisation intracellulaire

Les AEEC sont capables de moduler diverses voies de signalisation intracellulaires (DeVinney *et al.* 1999a). Il a été démontré que les EPEC engendrent un flux d'inositol phosphate (IP) à l'intérieur de la cellule, et que celui-ci dépend d'un SSTT fonctionnel, et de la présence du facteur EspB (Dytoc *et al.* 1994; Foubister *et al.* 1994a; Foubister *et al.* 1994b). Une des conséquences majeures de la production d'IP est le relargage de Ca^{2+} des divers compartiments intracellulaires. Malgré plusieurs études sur le sujet, aucune conclusion satisfaisante n'a pu être tirée concernant les effets probables de cette augmentation du $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$. Certaines études ont suggéré que l'augmentation du $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$ suite à une infection à EPEC est dépendante du SSTT et de l'adhérence intime à la cellule hôte via l'intimine (Baldwin *et al.* 1991; Dytoc *et al.* 1994). De plus, l'augmentation du $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$ peut être inhibée par le chélateur de canaux Ca^{2+} BAPTA (bis[o-aminophenoxy]-ethane-N,N,N',N'-tetraacetic acid), résultant en l'inhibition de la formation du piédestal (Baldwin *et al.* 1991). Néanmoins, ces résultats sont remis en doute. En effet, Bain *et al.* (Bain *et al.* 1998) ont récemment émis l'hypothèse voulant que l'augmentation du $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$ soit le résultat d'un effet cytotoxique des EPEC, plutôt qu'un effet imputable directement à la bactérie.

D'autre part, il a été démontré que les EPEC activent la protéine kinase C (PKC). Les premières évidences de l'activation de la PKC par les EPEC proviennent d'études de profils de phosphorylation protéique ayant démontré de nombreuses similitudes avec ceux induits par les principaux activateurs connus des PKC (Manjarrez-Hernandez *et al.* 1996). Par la suite, Crane et Oh (Crane et Oh 1997) ont démontré que l'augmentation des PKC membranaires en réponse à une infection à

EPEC est dépendante de l'adhérence intime via l'intimine. Récemment, il a été démontré que les EPEC induisent l'activation des kinases de la voie MEK/ERK (mitogen-activated protein kinase kinase/extracellular signal-regulated kinases) et des kinases p38 et Jun (Czerucka *et al.* 2001; de Grado *et al.* 2001). L'activation de la voie des kinases MEK/ERK mène à une augmentation de l'expression de *egr-1*. Ce gène code pour un facteur de transcription régulant l'expression de plusieurs gènes dont ceux codant pour le TNF- α , TGF- β , ICAM-1, CD44, M-CSF, ainsi que certaines métalloprotéases (de Grado *et al.* 2001).

L'augmentation du flux de l'IP, combiné à une augmentation du $\text{Ca}^{2+}_{\text{in}}$ et à l'activation des différentes kinases suggère l'implication d'une phospholipase. Kenny et Finlay (Kenny et Finlay 1997) ont décrit un second groupe de protéines dont les résidus de tyrosine sont phosphorylés suite à une infection à EPEC. Une de ces protéines a été identifiée comme étant la phospholipase $\text{C}\gamma$ ($\text{PLC}\gamma$). L'activation de la $\text{PLC}\gamma$ dépend de l'adhérence intime via l'intimine, mais celle-ci survient plus tardivement que la phosphorylation du récepteur Tir.

3. Autres pathogènes causant des lésions A/E

E. coli n'est pas la seule espèce bactérienne pouvant causer des lésions A/E. D'autres espèces bactériennes, telles *Citrobacter rodentium* (anciennement *Citrobacter freundii* biotype 4280) (Schauer et Falkow 1993a) et *Hafnia alvei* (Albert *et al.* 1991) ont la capacité d'induire de telles lésions. Les lésions A/E induites par *H. alvei* ont été associées à des cas de diarrhées humaines (Albert *et al.* 1991), alors que celles induites par *C. rodentium* sont associées à l'hyperplasie murine du côlon (Schauer et Falkow 1993a).

3.1 *Citrobacter rodentium*

C. rodentium est l'agent causal de l'hyperplasie cœlonique transmissible murine, une maladie à incidence naturelle chez les souris de laboratoire, caractérisée par une prolifération anormale des cellules épithéliales de la muqueuse du côlon descendant (Luperchio et Schauer 2001). L'hyperplasie atteint son maximum de 2 à 6 semaines après l'infection, pour ensuite régresser et revenir à la normale en moins de 8 semaines (Luperchio et Schauer 2001). Les souris adultes infectées par *C. rodentium* biotype 4280 démontrent de l'hyperplasie du côlon, mais le taux de morbidité et de mortalité demeure faible (Luperchio et Schauer 2001). Une grande quantité de bactéries intimement adhérees sont retrouvées au niveau du côlon descendant 4 à 10 jours après une inoculation orale de souris naissantes ou adultes. Les bactéries ainsi adhérees forment habituellement des piédestaux. Des réarrangements du cytosquelette cellulaire ont lieu au site d'adhérence, amenant la désorganisation du réseau de filaments (Luperchio et Schauer 2001). Ces changements histopathologiques sont indistinguables de ceux observés lors de la formation des lésions d'attachement et d'effacement chez les EPEC (Luperchio et Schauer 2001).

Tout comme les EPEC, *C. rodentium* possède le locus LEE de 35 kb (McDaniel *et al.* 1995). L'intimine codée par le gène *eae* de *C. rodentium* (intimine de type β) est très similaire à celle retrouvée chez les EPEC (Schauer et Falkow 1993a; Schauer et Falkow 1993b). Récemment, il a été démontré que l'intimine, ainsi que son récepteur Tir, sont des facteurs de virulence essentiels à la pathogenèse de *C. rodentium in vivo* chez la souris (Deng *et al.* 2003). En plus des divers facteurs du LEE, *C. rodentium* produit une toxine Shiga (Schauer et Falkow 1993b).

3.2 *Hafnia alvei*

H. alvei est un agent pathogène en émergence associé à des cas isolés, mais aussi à des épidémies de diarrhée. En plus de posséder le gène *eae*, certains isolats possèdent le locus LEE de 35 kb, et sont capables d'induire des lésions A/E (Albert *et al.* 1992; McDaniel *et al.* 1995). L'accumulation de phosphotyrosines, de même que le réarrangement de l' α -actinine du cytosquelette ont été observés, suite à l'adhérence aux cellules HEp-2 (Albert *et al.* 1992). Les souches d'*H. alvei* ne démontrent pas le phénotype LA en culture cellulaire (Albert *et al.* 1992). Il semble que le manque d'un plasmide associé à l'expression du EAF en soit la cause. Chez les lapins expérimentalement infectés avec *H. alvei*, la diarrhée est observée au quatrième jour; celle-ci dure 3 jours, pendant lesquels *H. alvei* est le seul microorganisme isolé des fèces des animaux infectés (Albert *et al.* 1992). Malgré le fait que tous les facteurs de virulence n'ont pas encore été découverts, le gène *eae* semble hautement associé au phénotype A/E d'*H. alvei* en culture cellulaire (Ismaili *et al.* 1996).

4. Déterminants génétiques des AEEC

4.1 Le locus d'effacement des entérocytes (LEE)

Le locus LEE est un îlot de pathogénicité de 35,6 kb (LEE_{EPEC}) à 43 kb (LEE_{STEC}) d'origine chromosomique et a été identifié pour la première fois chez la souche EPEC E2348/69 (McDaniel *et al.* 1995; Collington *et al.* 1998a). Ce locus est aussi présent chez *C. rodentium* et *H. alvei*, mais est totalement absent chez les souches ne produisant pas de lésions A/E (Albert *et al.* 1991; Schauer et Falkow 1993a; McDaniel *et al.* 1995; Goffaux *et al.* 1997). LEE a une teneur en G+C (38,3%) inférieure à la teneur globale en G+C d'*E. coli* (50,8%), suggérant que le locus LEE soit le résultat d'un transfert génétique à l'horizontal d'une autre espèce

bactérienne (Frankel *et al.* 1998a). Le locus LEE de la souche EPEC E2348/69 (Figure 5) possède 41 cadres de lecture ouverts (open reading frames, ORFs), tous présents sur le LEE des STEC A/E+ et celui de *C. rodentium* (Elliott *et al.* 1998; Frankel *et al.* 1998a; Mundy *et al.* 2004). Le LEE est organisé en cinq opérons. La région centrale (Tir) contient les gènes *tir*, *cesT* et *eae*, principaux intervenants dans l'adhérence intime de la bactérie à la muqueuse intestinale (Frankel *et al.* 1998a). En amont de l'opéron Tir se trouvent les gènes codant pour le SSTT (LEE1 à LEE3) (Elliott *et al.* 1998; Frankel *et al.* 1998a). Neuf de ces gènes sont homologues aux gènes *ysc* codant pour les composants du SSTT de *Yersinia sp.*, *Shigella sp.*, *Salmonella sp.* et autres pathogènes possédant cet important système de sécrétion des protéines (Frankel *et al.* 1998a). Le quatrième opéron du locus LEE (LEE4) est située en aval du gène *eae* et code principalement pour trois protéines sécrétées par le SSTT, soit EspA, EspB et EspD (Figure 5) (Zhu *et al.* 1994; Frankel *et al.* 1998a).

Le locus LEE_{EPEC} entier a été cloné dans un plasmide simple et son insertion dans la souche d'*E. coli* K-12 s'est avérée suffisante pour lui conférer le pouvoir d'induire les lésions A/E (McDaniel et Kaper 1997), alors que l'insertion du LEE_{STEC} s'en est avérée incapable (Elliott *et al.* 1999a). Les 41 gènes du locus LEE de la souche EPEC E2348/69 se retrouvent dans le même ordre que sur le locus LEE des souches STEC_{O157:H7} et la séquence de nucléotides de ces 41 gènes est similaire à 93,9% (Frankel *et al.* 1998a; Perna *et al.* 1998). Par contre, certains gènes ne partagent pas ce haut taux d'homologie entre les deux pathotypes (Frankel *et al.* 1998a; Perna *et al.* 1998). Les gènes *eae*_{EPEC} et *eae*_{STEC} ne sont homologues qu'à 87,23%, *espB* à 74,01%, *espA* à 84,63%, *espD* à 80,36% et *tir* à 66,48% (Frankel *et al.* 1998a; Perna *et al.* 1998). La variation dans la séquence de ces gènes pourrait être due à une sélection naturelle visant à échapper au système immunitaire de la cellule hôte (Frankel *et al.* 1998).

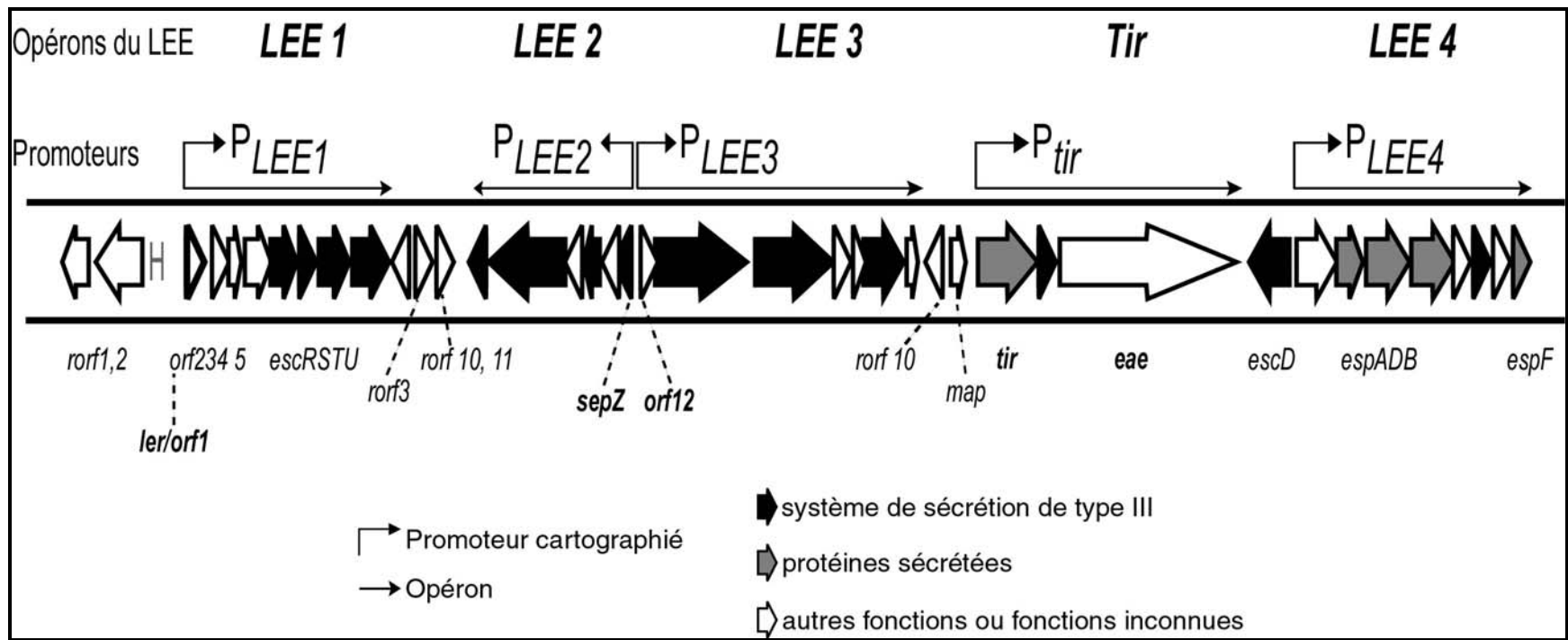


Figure 5. Carte du locus LEE de la souche EPEC humaine E2348/69. Adapté de Elliott *et al.*, 2000 (Elliott *et al.* 2000).

4.1.1 Le gène *eae*

Le gène *eae*, situé sur le LEE5 ou Tir, possède un ORF de 2817 pb codant pour une protéine de la membrane externe (outer membrane protein, OMP) de 94 kDa appelée intimine (Donnenberg et Kaper 1992). Cette OMP est très bien conservée chez les AEEC de même séro groupe O (Gannon *et al.* 1993). Le gène *eae* se retrouve chez les EPEC et les STEC A/E+, mais aussi chez les AEEC des lapins, des porcs (Zhu *et al.* 1995a), des chiens, de même que chez *H. alvei* et *C. rodentium* (Jerse et Kaper 1991; Albert *et al.* 1992; Pohl *et al.* 1993; Schauer et Falkow 1993a; Drolet *et al.* 1994).

L'intimine est responsable de l'adhérence bactérienne intime, conjointement avec son récepteur Tir, et de l'accumulation d'actine dans les cellules HEp-2 par la souche EPEC E2348/69 (Jerse *et al.* 1990). Cette protéine renferme trois domaines distincts, soit un domaine N-terminal flexible (acides aminés 40-188), un domaine central en tonneaux β s'intégrant à la membrane bactérienne (acides aminés 189-549), et un domaine de liaison de Tir (acides aminés 550-939) (Touze *et al.* 2004). En microscopie électronique, l'intimine forme une structure en anneau possédant un diamètre extérieur d'environ 7 nm et un noyau dense aux électrons. De plus, elle forme des canaux d'une conductance de 50 picoSiemens en bicouches lipidiques planaires (Touze *et al.* 2004). Le domaine en tonneaux β permet aussi la dimérisation de l'intimine.

Il existe quatorze sous-types d'intimine associés aux AEEC (α 1, α 2, β , γ , κ , ϵ , η , ι , λ , θ , ζ , μ , ν , et ξ) (Ramachandran *et al.* 2003). Néanmoins, seulement 5 sous-types (α , β , γ , δ et ϵ) peuvent être différenciés selon la variation antigénique des 280 acides aminés (Int280) de leur portion C-terminale (Adu-Bobie *et al.* 1998a; Oswald *et al.* 2000). Récemment, des études utilisant la résonance magnétique nucléaire multidimensionnelle (NMR) ont démontré que la région Int280 comprend trois

parties, deux domaines immunoglobuline-like et une partie C-terminale lectine-like (Frankel *et al.* 1998a).

Le gène *eae* n'est pas responsable, à lui seul, de l'apparition des lésions A/E (Zhu *et al.* 1994) mais sa présence est essentielle. L'expression de l'intimine, régulée par le locus *per*, est influencée par la phase de croissance et par la température ambiante (Frankel *et al.* 1998a). Son expression est maximale vers la fin de la phase exponentielle ou au début de la phase de plateau à 37°C (Knutton *et al.* 1997), alors que les protéines sont distribuées uniformément à la surface de la bactérie (Frankel *et al.* 1998a).

4.1.2 Le gène *tir* (translocated intimin receptor)

Le gène *tir* code pour Tir (78-80 kDa), un récepteur pour l'intimine, présent sur le LEE (DeVinney *et al.* 1999b). Cette protéine, originalement appelée Hp90 ou EspE (Rosenshine *et al.* 1996; Deibel *et al.* 1998), sert à la liaison avec l'intimine, permettant ainsi l'adhérence intime des bactéries avec la muqueuse intestinale (Rosenshine *et al.* 1996; Neves *et al.* 1998) et la formation du piédestal lors du développement des lésions A/E (DeVinney *et al.* 1999b). Tir est transloqué de la bactérie vers le cytoplasme de la cellule hôte infectée via l'appendice filamenteux EspA (Ebel *et al.* 1998b). Il subit, dans le cas des EPEC, une phosphorylation de ses résidus de tyrosine (DeVinney *et al.* 1999b) pour apparaître comme une protéine phosphorylée de 90 kDa sur SDS-PAGE (Rosenshine *et al.* 1992a), alors que celui des STEC_{O157:H7} n'est pas phosphorylé à la suite de sa translocation dans le cytoplasme de la cellule hôte (Kenny *et al.* 1997b; Deibel *et al.* 1998). D'un point de vue biochimique, le Tir des STEC A/E+ n'est pas fonctionnellement interchangeable avec celui des EPEC (Kenny 2001).

L'interaction de Tir avec l'intimine est essentielle afin d'induire l'adhérence intime et amener la réorganisation du cytosquelette adjacent (Kenny *et al.* 1997b; An

et al. 1999b). La liaison intimine-Tir résulte en un réarrangement excessif du cytosquelette cellulaire et module l'activation de la PLC γ (DeVinney *et al.* 1999b). On associe trois régions fonctionnelles à Tir : un domaine extracellulaire permettant l'interaction avec l'intimine, un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique pouvant induire la polymérisation localisée de l'actine et des autres protéines du cytosquelette de la cellule hôte et ainsi, provoquer la création de la structure en piédestal caractéristique des lésions A/E (Deibel *et al.* 1998). La partie N-terminale de Tir permet le transport de la protéine à l'intérieur de la cellule hôte via un signal CesT-indépendant (Crawford et Kaper 2002). On tend aussi à associer à Tir des effets apoptotiques (Malish *et al.* 2003).

Une fois inséré dans la membrane de la cellule-hôte, Tir_{EPEC} interagit directement et spécifiquement avec Nck, une protéine adaptatrice de l'hôte possédant des domaines SH2/SH3 lui permettant de relier les récepteurs tyrosine phosphorylés (tyrosine 474) au cytosquelette d'actine (Gruenheid *et al.* 2001). La phosphorylation de la tyrosine permet aussi le recrutement de deux composants importants du cytosquelette, soit N-WASP (neural Wiskott-Aldrich syndrome protein) et le complexe Arp2/3, tous deux requis pour la formation du piédestal (Kalman *et al.* 1999; Goosney *et al.* 2000). Dans le cas du Tir_{STEC}, celui-ci interagit, de façon indirecte, avec la protéine bactérienne transloquée TccP (Garmendia *et al.* 2004), permettant la liaison de Tir aux différentes protéines du cytosquelette, telle l'actine. Récemment, Campellone *et al.* (Campellone *et al.* 2004) ont caractérisé la protéine EspF_U (aussi nommé TccP par Garmendia *et al.*, 2004), dont le rôle est d'interagir avec Tir et N-WASP et ainsi permettre l'assemblage Nck-indépendant de l'actine (Figure 6).

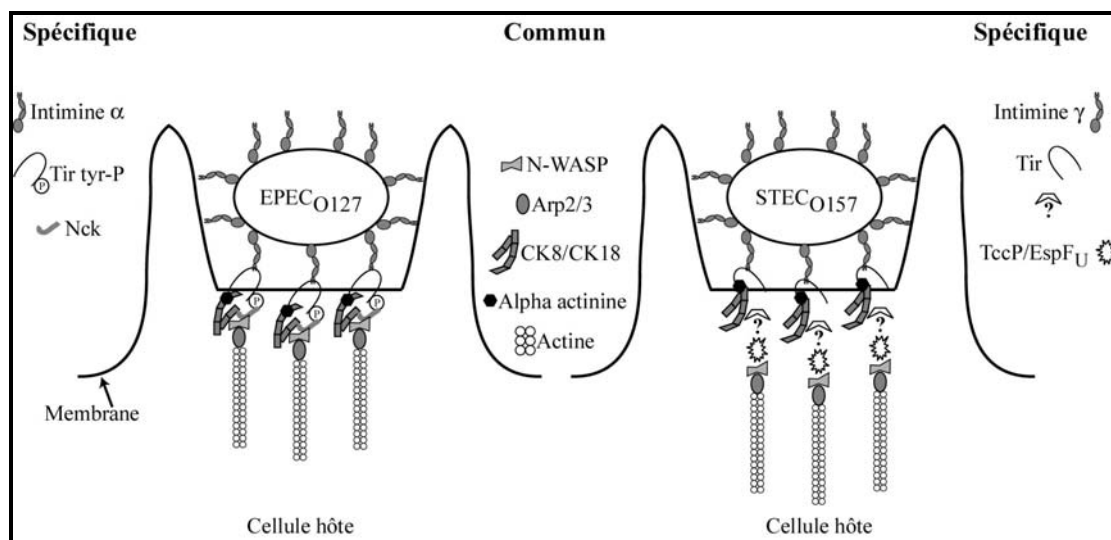


Figure 6. Cascades menant à la polymérisation de l'actine chez les EPEC_{O127} et les STEC_{O157} durant la formation des lésions A/E. Adapté de Campellone *et al.* (Campellone *et al.* 2004) et de Garmendia *et al.*, 2004 (Garmendia *et al.* 2004).

Il a été démontré récemment (Batchelor *et al.* 2004) que Tir_{EPEC} interagit avec la cytokératine 18, filament intermédiaire et principal marqueur du cytosquelette des cellules M (Gebert *et al.* 1994), majoritairement retrouvées au niveau de l'épithélium recouvrant les PP chez le porc (Gebert *et al.* 1994; Gebert *et al.* 1999). *In vitro*, la cytokératine 18 serait directement impliquée dans la condensation de l'actine et la réorganisation du cytosquelette de la cellule hôte (Batchelor *et al.* 2004). Le rôle précis de l'association Tir-cytokératine 18 n'est pas connu, mais il est possible que la cytokératine relie ensemble la bactérie (via Tir) et les filaments intermédiaires du cytosquelette de la cellule hôte.

4.1.3 Le système de sécrétion de type III (SSTT)

Une grande variété de bactéries à Gram négatif telles *Shigella sp.*, *Salmonella sp.*, *E. coli* et *Yersinia sp.* contiennent des gènes codant pour l'appareillage d'un

SSTT (Ebel *et al.* 1998b). Ce système ne fait pas qu'excréter des protéines en dehors de la bactérie jusque dans le liquide extracellulaire, mais sert aussi à la translocation de certains facteurs de virulence dans la cellule hôte infectée (Ebel *et al.* 1998b). Une fois dans la cellule hôte, ces facteurs de virulence jouent divers rôles propres aux bactéries qui les sécrètent (Ebel *et al.* 1998b). Les protéines sécrétées par le SSTT ont tendance à former des structures macromoléculaires (Figure 7) (Ebel *et al.* 1998b; Garmendia *et al.* 2005).

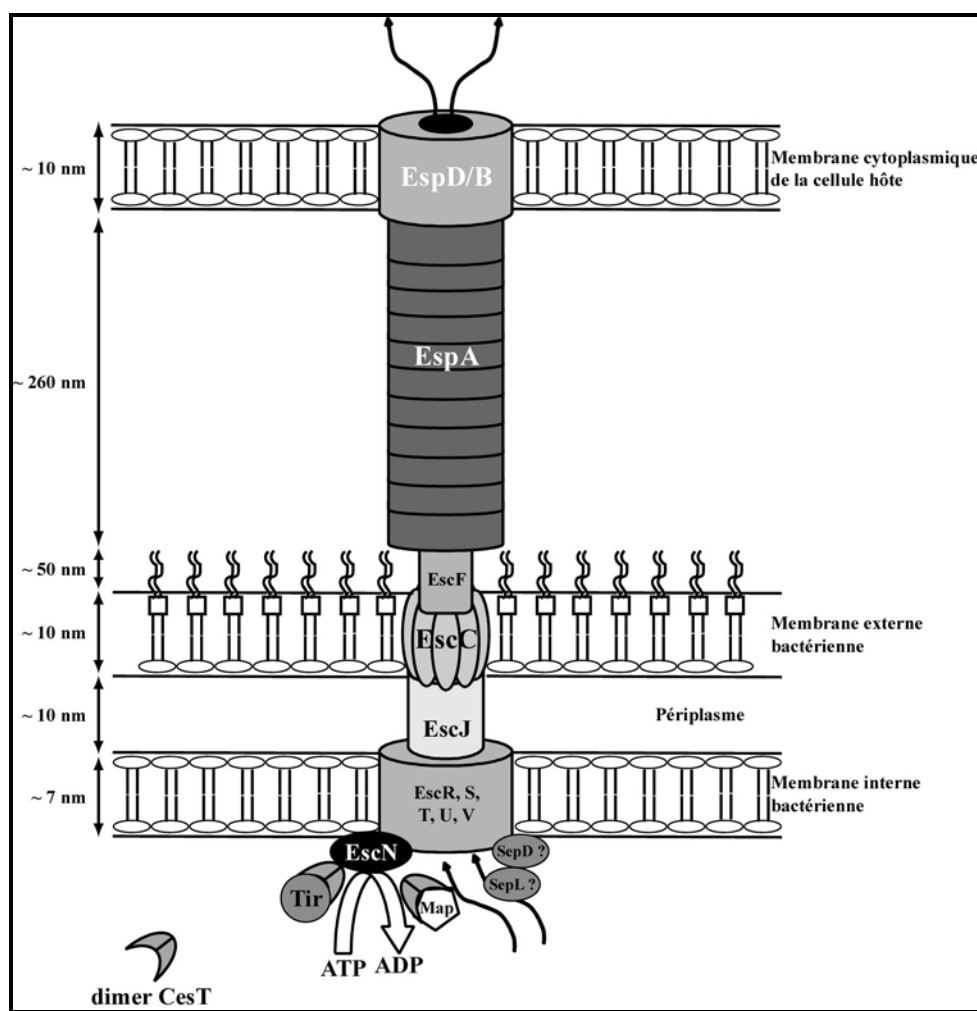


Figure 7. Représentation schématique de l'appareillage du système de sécrétion de type III des EPEC et des STEC A/E+. La base est composée de la sécrétine EscC, des protéines de la membrane interne EscR, EscS, EscT, EscU et EscV, ainsi que de la lipoprotéine EscJ, laquelle fait le lien entre les structures de la membrane interne et

externe. EscF constitue la structure en aiguille, alors que les sous-unités EspA polymérisent pour former le filament EspA. Les protéines EspB et EspD forment le pore de translocation au niveau de la membrane cytoplasmique de la cellule hôte, permettant la liaison de la bactérie à la cellule hôte via le filament EspA. L'ATPase cytoplasmique EscN procure l'énergie au système en hydrolysant l'ATP en ADP. Les protéines SepD et SepL sont représentées ici en tant que composants cytoplasmiques du SSTT. Adapté de Garmendia *et al.*, 2005 (Garmendia *et al.* 2005).

Les EPEC et les STEC A/E+ utilisent le SSTT du locus LEE pour sécréter différentes protéines comme EspA, EspB et EspD (Jarvis et Kaper 1996; Frankel *et al.* 1998a; Kaper *et al.* 1998; Nataro et Kaper 1998). Récemment, il a été démontré que l'induction de la sécrétion de protéines par les souches EPEC est multifactorielle (An *et al.* 1999b). La sécrétion des protéines Esp est essentielle à l'induction d'un signal de transduction chez la cellule hôte amenant la formation des lésions A/E (Frankel *et al.* 1998a; Kaper *et al.* 1998; Nataro et Kaper 1998). Celle-ci est induite lorsque la bactérie croît dans un milieu de culture pour cellules eucaryotes ou en réponse à des conditions de croissance similaires à celles retrouvées dans le tractus gastro-intestinal (Frankel *et al.* 1998a; Kaper *et al.* 1998; Nataro et Kaper 1998). La base structurale exacte permettant la translocation de protéines via le SSTT n'est pas encore élucidée (Hueck 1998).

4.1.3.1 Le système de gènes *sep* (secretion of EPEC proteins)

Le locus *sep* (secretion of *E. coli* proteins) contient 4 gènes fonctionnels, soit *sepA*, *sepB*, *sepC* et *sepD* (Zhu *et al.* 1994). Ce locus est situé à 12 kb en aval du gène *espB* et est nécessaire à l'exportation des déterminants de virulence des EPEC et des STEC A/E+ (Jarvis *et al.* 1995). L'ensemble de gènes *sep* est homologue aux gènes codant pour le SSTT retrouvé chez d'autres pathogènes entériques tels *Yersinia sp.*, *Shigella sp.* et *Salmonella sp.* (Jarvis *et al.* 1995; An *et al.* 1999b). Récemment, il a

été démontré que le locus LEE contient l'ensemble de gènes *sep* (Jarvis *et al.* 1995; McDaniel *et al.* 1995; Kenny *et al.* 1997b; An *et al.* 1999b). La protéine codée par le gène *sepA* partage une homologie de 54% avec les 345 résidus de la protéine LcrD de *Yersinia sp.*, 35% d'homologie avec les 639 résidus de MxiA (*Shigella sp.*) et 38% d'homologie avec les 633 résidus de InvA de *Salmonella sp.* (Kaper *et al.* 1997). La protéine codée par le gène *sepB* possède une forte homologie avec les ATPase retrouvées chez *E. coli*, les chloroplastes et les mitochondries, de même qu'avec les produits des gènes du SSTT de *Shigella*, *Yersinia* et *Salmonella* (Kaper *et al.* 1997).

4.1.4 Les gènes *esp* (EPEC secretory proteins) présents sur le LEE

La plupart des gènes *esp* sont situés sur le locus LEE et sont impliqués dans l'induction d'un signal de transduction vers la cellule hôte (Foubister *et al.* 1994b). Les produits de ces gènes utilisent le SSTT des AEEC comme principale méthode d'exportation vers la cellule hôte (Foubister *et al.* 1994b; Jarvis *et al.* 1995; An *et al.* 1999b). Les 4 principaux gènes *esp* sont *espA*, *espB*, *espD*, et *espF* (Deibel *et al.* 1998). Ces gènes sont bien caractérisés chez les AEEC mais leur rôle précis dans le développement des lésions A/E n'est pas encore connu (Taylor *et al.* 1999). *In vitro*, la sécrétion de leurs produits est influencée par des conditions mimant celles retrouvées dans le tractus gastro-intestinal (Kenny *et al.* 1997a).

4.1.4.1 Le gène *espA*

Le gène *espA* est situé en aval du gène *eae* et en amont du gène *espD* sur le locus LEE4 (Neves *et al.* 1998). Il code pour la protéine EspA (25 kDa), principal constituant d'un long appendice filamenteux à la surface des EPEC et des STEC A/E+, connu sous le nom de filament EspA (Knutton *et al.* 1998; Neves *et al.* 1998).

Ce filament apparaît lors de la formation des lésions A/E, forme un lien direct entre la bactérie et la cellule hôte et est requis pour la translocation de EspB et Tir vers la cellule hôte (Knutton *et al.* 1998; Neves *et al.* 1998). Chaque filament EspA mesure environ 2 μm de long, possède un diamètre d'environ 50 nm et est composé d'un nombre variable de petits filaments de 7 nm de diamètre formant une structure cylindrique (Frankel *et al.* 1998a). Chez les STEC_{O157:H7}, EspA est le principal constituant d'un long appendice filamenteux à la surface des bactéries mais n'induit pas l'accumulation d'actine polymérisée dans le cytoplasme de la cellule hôte, indiquant qu'il intervient au niveau de l'adhérence initiale et non de l'adhérence intime proprement (Ebel *et al.* 1998b). *In vitro*, il n'est exprimé qu'au début du développement des lésions A/E et semble disparaître complètement après l'adhérence intime avec la cellule épithéliale (Knutton *et al.* 1998). Une délétion complète de *espA* empêche les souches STEC A/E+ d'adhérer aux cellules HeLa *in vitro* et ainsi, empêche le réarrangement d'actine dans les macrophages et les cellules épithéliales infectées *in vitro* (Ebel *et al.* 1998b). Par contre, des souches STEC complémentées avec le gène *espA* adhèrent aux cellules HeLa *in vitro*, forment l'appendice filamenteux EspA et induisent la prolifération d'actine et le réarrangement du cytosquelette (Ebel *et al.* 1998b). Il semble donc que le filament EspA soit nécessaire dans la translocation des protéines infectieuses des STEC A/E+ dans la cellule hôte (Ebel *et al.* 1998b). Les polypeptides composants le filament EspA sont homologues chez 65% des souches EPEC (Neves *et al.* 1998). Chez les EPEC, l'utilisation de mutants ΔespA montre que ces souches sont capables d'adhérer à la cellule hôte mais sont incapables de moduler le signal de transduction nécessaire à la réorganisation du cytosquelette et à la prolifération de l'actine dans la cellule hôte (Kenny *et al.* 1996). Récemment, on a trouvé qu'EspA n'est pas directement impliqué dans l'activation d'un signal vers la cellule hôte (Frankel *et al.* 1998a). Ce dernier jouerait un rôle accessoire dans l'adhérence bactérienne (Cleary *et al.* 2004) mais aussi dans la translocation de diverses protéines vers la cellule hôte telles EspB (Knutton *et al.* 1998; Wolff *et al.* 1998) et Tir (Kenny *et al.* 1997b). Un filament semblable au filament EspA est retrouvé chez *Pseudomonas syringae* et semble indiquer qu'un appendice de la sorte soit commun à plusieurs bactéries utilisant le SSTT comme

moyen d'exportation des facteurs de virulence vers la cellule hôte (Ebel *et al.* 1998b). La présence du filament EspA peut représenter une cible intéressante dans le but d'élaborer un vaccin contre les souches EPEC (Neves *et al.* 1998). Par contre, une étude récente a démontré un polymorphisme important entre le filament EspA des EPEC et celui des STEC_{O157:H7}, puisqu'un antisérum dirigé contre la protéine EspA de la souche EPEC E2348/69 ne reconnaît pas la protéine EspA de la souche STEC_{O157:H7} 85-170 et vice et versa (Neves *et al.* 2003), suggérant une variation dans l'exposition de certains épitopes. Une telle variation devra être considérée lors de la mise au point d'un vaccin anti-EspA à large spectre.

4.1.4.2 Le gène *espB*

Le gène *espB* est situé à 4,4 kb en aval du gène *eae* (Donnenberg *et al.* 1993a). Son produit, la protéine EspB (37 kDa), comporte une séquence consensus de liaison du pyridoxal-5'-phosphate, mais aucune trace de cette substance n'a été retrouvée, *in vitro*, dans le surnageant de culture des EPEC (Taylor *et al.* 2001).

EspB est directement impliqué dans l'accumulation d'actine cellulaire sous le site d'attachement des EPEC sur la cellule hôte, mais son expression *in vitro* ne semble pas être suffisante afin d'induire ces changements morphologiques (Taylor *et al.* 1999). Des études utilisant des cellules HeLa auxquelles on a greffé le gène *espB* et un promoteur eucaryote, conjointement à un mutant EPEC E2348/69 $\Delta espB$ ont démontrées une diminution marquée du réarrangement du cytosquelette comparé à l'utilisation de cellules HeLa normales et de la souche EPEC E2348/69 (Taylor *et al.* 1999). De plus, EspB est requis afin de permettre l'association de Tir à la membrane cellulaire de l'hôte (Kenny *et al.* 1997b). Suite à sa translocation, la protéine EspB peut être détectée dans le cytoplasme, de même que dans la membrane cytoplasmique de la cellule hôte (Wolff *et al.* 1998). Son implication dans le développement des lésions A/E par *C. rodentium* chez la souris a aussi été démontrée (Newman *et al.* 1999).

L'utilisation d'antisérum anti-EspB a démontré qu'EspB ne fait pas partie du filament EspA (Frankel *et al.* 1998a). Par contre, le filament EspA est essentiel afin de permettre à EspB d'être transloqué vers la membrane et le cytosol de la cellule hôte (Knutton *et al.* 1998; Wolff *et al.* 1998). La synthèse de EspB par la bactérie semble être dépendante du contact de la bactérie avec la cellule hôte, provoquant une augmentation significative de sa synthèse (Frankel *et al.* 1998a). En absence de contact avec la cellule intestinale, le taux de synthèse de EspB demeure très bas mais tout de même constant chez les EPEC (Frankel *et al.* 1998a), et sa translocation ne requiert pas l'adhérence intime, même si cette dernière semble grandement l'influencer (Wolff *et al.* 1998). *In vitro*, l'expression et la sécrétion de la protéine EspB des EPEC dans le surnageant de culture est activée en DMEM en absence de sérum fœtal bovin (Ebel *et al.* 1996; An *et al.* 1999b).

4.1.4.3 Le gène *espD*

Le gène *espD*, situé en amont du gène *espB* sur le LEE, code pour une protéine de 39 kDa, EspD (Lai *et al.* 1997). Des études récentes ont démontré que des mutants $\Delta espD$ sont incapables d'enclencher le réarrangement du cytosquelette typique des lésions A/E mais conservent leur capacité à adhérer aux cellules eucaryotes (Lai *et al.* 1997; Kresse *et al.* 1999). Des résultats démontrent que EspD joue un rôle plus significatif dans la pathogenèse des infections à STEC A/E+ que dans celle des infections à EPEC (Kresse *et al.* 1999). Ces mêmes résultats indiquent que EspD est essentiel à la formation d'appendice à la surface de la bactérie, qu'il est intégré à la membrane cytoplasmique des cellules cibles et qu'il participerait à la translocation de molécules effectrices vers la cellule eucaryote (Kresse *et al.* 1999).

4.1.4.4 Le gène *espF*

La protéine EspF est codée par le gène *espF* situé en aval des gènes *espABD* à l'extrémité du locus LEE (Frankel *et al.* 1998a; McNamara et Donnenberg 1998). Cette protéine de 206 acides aminés renfermerait trois séquences répétées de 19 acides aminés riches en proline. Malgré le fait qu'ils démontrent un phénotype identique à celui de la souche sauvage EPEC E2348/69 en ce qui concerne l'adhérence, l'invasion, la condensation de l'actine et la phosphorylation des résidus de tyrosine (Frankel *et al.* 1998a; McNamara et Donnenberg 1998), les mutants $\Delta espF$ n'ont plus la capacité d'induire l'apoptose des cellules épithéliales en culture (Crane *et al.* 2001).

L'apoptose est un mécanisme intrinsèque responsable de la suppression physiologique des cellules (Malish *et al.* 2003). Elle se caractérise par des changements morphologiques distincts du noyau et du cytoplasme, des coupures de la chromatine sur des sites régulièrement espacés, et des coupures endonucléasiques de l'ADN génomique entre les nucléosomes. Ce mode de mort cellulaire sert d'équilibre à la mitose en adaptant la taille des tissus animaux et en limitant les processus pathologiques liés à la croissance tumorale.

Compte tenu de la structure riche en proline, la capacité de la protéine EspF à induire l'apoptose semble résider sur sa capacité à se lier aux domaines de signalisation intracellulaire SH3 et EVH1 (Crane *et al.* 2001). EspF est aussi requis afin d'obtenir une altération des jonctions serrées *in vitro* (McNamara *et al.* 2001).

4.1.4.5 Autres gènes *esp*

D'autres gènes appartenant au système *esp* auraient un rôle à jouer dans le développement des lésions A/E. Ainsi, le produit du gène *espG*, codant pour un

homologue EspG de la protéine VirA de *Shigella flexneri*, est sécrété par le SSTT, mais son rôle dans le développement des lésions A/E est encore inconnu, bien que sa délétion réduise considérablement la colonisation d'une souche REPEC (Elliott *et al.* 2001). Le produit du gène *espH*, la protéine EspH, serait impliqué dans l'élongation des piédestaux *in vitro* (Tu *et al.* 2003).

4.1.5 Le gène *cesD*

Le gène *cesD* code pour la protéine CesD, nécessaire à la sécrétion de EspB et EspD via le SSTT (Frankel *et al.* 1998a; Wainwright et Kaper 1998). Cette protéine agit ainsi comme un chaperon de sécrétion chez les EPEC (Wainwright et Kaper 1998). Une mutation dans le gène *cesD* élimine la sécrétion de EspD dans le surnageant des cellules en culture, diminue la sécrétion de EspB mais n'agit pratiquement pas sur la sécrétion de EspA (Wainwright et Kaper 1998). Des quantités importantes de CesD sont retrouvées dans le surnageant et associées à la membrane interne de la bactérie (Wainwright et Kaper 1998).

4.1.6 Le gène *cesT*

Il a été démontré que le gène *orfU*, dorénavant appelé *cesT* pour « chaperone for *E. coli* secretion of Tir », code pour une protéine chaperon du récepteur Tir appelée CesT (Elliott *et al.* 1999b). Cette petite protéine cytoplasmique de 15 kDa présente une très forte homologie de séquence entre les différents pathotypes d'*E. coli* induisant des lésions A/E (97,5% entre la souche EPEC E2348/69 et les diverses souches STEC_{O157:H7}, de même qu'avec *C. rodentium* (96,8%)) (Elliott *et al.* 1999b). Sa localisation cytoplasmique est très semblable à celle retrouvée chez les autres protéines chaperons associées au SSTT mais elle diffère de celle de CesD,

normalement retrouvée dans le cytoplasme et la membrane cellulaire (Elliott *et al.* 1999b). Il a été démontré qu'une mutation dans le gène *cesT* affecte la sécrétion, la stabilité et les fonctions propres à Tir, sans pour autant affecter les autres facteurs de virulence (Elliott *et al.* 1999b). Les mutants $\Delta cesT$ sécrètent tout de même une quantité minimale de Tir, suggérant que CesT n'est pas absolument requise pour sa sécrétion (Elliott *et al.* 1999b). CesT aurait un rôle à jouer aussi dans la régulation post-transcriptionnelle de Tir (Elliott *et al.* 1999b) et dans son transport intracellulaire (Crawford et Kaper 2002). À ce sujet, Gauthier et Finlay (Gauthier et Finlay 2003) ont démontré que CesT interagit de façon spécifique avec l'ATPase du SSTT, EscN, dans le but de transloquer Tir.

4.1.7 Le gène *orf19/map*

Le gène *map* (anciennement appelé *orf19*) code pour une protéine effectrice d'environ 20 kDa appelée Map, ou « mitochondrial associated protein » (Kenny et Jepson 2000). *In vitro*, cette protéine est sécrétée par le SSTT, sa présence n'influence pas la sécrétion du facteur EspB, mais la translocation de Map est dépendante de ce dernier. Suite à l'infection de cellules HeLa, Map se retrouve à l'intérieur des mitochondries, sa présence semble altérer le potentiel de membrane des mitochondries (Kenny et Jepson 2000).

Plusieurs hypothèses ont été émises quant au rôle de Map dans la pathogenèse des EPEC. Considérant sa localisation intracellulaire, il est possible que Map affecte localement la concentration ATP/ADP dans le but d'affecter la fonction des canaux à ions ATP-dépendant (Kenny et Jepson 2000). Certains produits des EPEC (Tir, EspF) étant impliqués dans l'apoptose et les mitochondries ayant un rôle central dans le relargage de produits pro-apoptotiques (Bernardi *et al.* 1999), il est possible que Map augmente la sensibilité des cellules hôte à l'apoptose causée par les EPEC, ou qu'elle empêche le relargage des produits pro-apoptotiques par la cellule infectée (Kenny et

Jepson 2000). Map serait également impliqué dans le réarrangement du cytosquelette de la cellule hôte par les EPEC, résultant en la formation de pseudopodes transitoires dépendant d'une GTPase, la protéine Cdc42 (Kenny *et al.* 2002).

4.2 Autres déterminants génétiques des AEEC

4.2.1 Autres gènes *esp*

4.2.1.1 Le gène *espC*

Le gène *espC* code pour une entérotoxine (EspC) de 100 kDa qui, contrairement aux autres protéines Esp, n'est pas sécrétée par le SSTT (Stein *et al.* 1996; An *et al.* 1999b; Mellies *et al.* 2001). Ce gène est situé à 60 minutes sur le chromosome et le produit EspC jouerait un rôle accessoire dans la pathogenèse de certaines souches EPEC (Mellies *et al.* 2001). Une mutation du gène *espC* n'affecte en rien la capacité des EPEC à désorganiser le cytosquelette cellulaire, à phosphoryler le récepteur Tir, et à adhérer ou envahir trois différentes lignées cellulaires en culture (Stein *et al.* 1996).

4.2.1.2 Les gènes *espF_U/tccp*

Récemment, Campellone *et al.* (Campellone *et al.* 2004), de même que Garmendia *et al.* (Garmendia *et al.* 2004) ont identifié un prophage cryptique (CP-933U ou CP_U), porté sur l'îlot-O #79 de la souche STEC A/E+ TUV93-0, un mutant Stx négatif de la souche STEC_{O157:H7} EDL933 (Campellone *et al.* 2002) qui, une fois délété, était incapable de former des piédestaux d'actine *in vitro*. La région CP_U contient 46 ORFs et un de ces ORFs (ORFZ3072), situé à l'extrémité 5', coderait pour un homologue (35% de similarité protéique) de EspF, appelé EspF_U

(Campellone *et al.* 2004) ou TccP (Tir-cytoskeleton coupling protein) (Garmendia *et al.* 2004), tous deux codant pour une protéine de 384 acides aminés ayant un poids moléculaire théorique de 42,462 kDa. *In vitro*, EspF_U/TccP est retrouvé localisé au site de nucléation de l'actine suite à sa translocation via le SSTT, ne module pas l'expression, la modification, ou la localisation membranaire de Tir (Campellone *et al.* 2004; Garmendia *et al.* 2004) et EspA (Garmendia *et al.* 2004) et une fois cloné dans une souche EPEC exprimant le Tir_{STEC}, il permet la formation de pieds d'actine Nck-indépendants (Campellone *et al.* 2004). EspF_U/TccP est aussi requis afin de recruter les protéines N-WASP, Arp2/3 (Campellone *et al.* 2004; Garmendia *et al.* 2004) et l'alpha actinine (Garmendia *et al.* 2004) (voir section Tir, Figure 6), et agit comme intermédiaire, via son domaine C-terminal riche en proline, entre Tir et le domaine de liaison de la GTPase de N-WASP durant la formation des pieds d'actine.

4.2.1.3 Le gène *espI*

Récemment caractérisé chez *C. rodentium* (Mundy *et al.* 2004), la protéine EspI ($\approx$ 47 kDa), codée par le gène *espI*, est un homologue de la protéine P54 des STEC A/E+ (Kresse *et al.* 2000). Ce gène est retrouvé hors du LEE chez *C. rodentium* et les EPEC, et est retrouvé sur le prophage CP-933P chez la souche STEC_{O157:H7} EDL933 (Mundy *et al.* 2004). En dépit du peu d'information sur son rôle exact dans la pathogenèse des lésions A/E, il a néanmoins été démontré que EspI n'est pas requis pour l'induction proprement dite des lésions A/E (test de FAS négatif *in vitro*), et que cette protéine semble impliquée dans la colonisation du côlon et dans l'hyperplasie colonique *in vivo* chez la souris (Mundy *et al.* 2004).

4.2.1.4 Le gène *espJ*

Le gène *espJ*, retrouvé à l'extrémité 5' du prophage cryptique CP-933U de la souche STEC_{O157:H7} EDL933, code pour une protéine effectrice de 217 acides aminés, EspJ, sécrétée par le SSTT, et partageant 22% d'identité avec HopF, une protéine effectrice de *P. syringae* (Dahan *et al.* 2005). Ce gène, situé en amont de EspF_U/TccP, est aussi retrouvé chez la souche STEC_{O157:H7} Sakai, la souche EPEC humaine E2348/69 (O127:H6), et chez *C. rodentium*, mais est absent du génome de la souche de *E. coli* K-12. *In vitro*, ce gène est régulé négativement lors de l'adhérence intime d'un variant Stx-négatif de la souche Sakai à la membrane des globules rouges (Dahan *et al.* 2004). EspJ est transloquée dans le cytoplasme de la cellule hôte, mais n'est pas requise au développement des lésions A/E, tant *in vitro* qu'en IVOC. *In vivo*, EspJ agirait comme un facteur « anti-virulence » puisque son absence augmente la persistance de *C. rodentium* chez la souris et de la souche STEC_{O157:H7} 85-170 chez le mouton (Dahan *et al.* 2005). EspJ favoriserait donc la survie de l'hôte infecté, et du même coup, la transmission du pathogène à un autre animal, tel qu'observé chez d'autres pathogènes tel *S. enterica* (Mouslim *et al.* 2002) et *Streptococcus pyogenes* (Engleberg *et al.* 2001).

4.2.2 Le plasmide EAF

Le plasmide EAF (EPEC adherence factor) est un grand plasmide (80 kb) d'environ 50-70 MDa, retrouvé chez les EPEC typiques (Baldini *et al.* 1983; Baldini *et al.* 1986; Nataro *et al.* 1987), et impliqué dans la régulation de l'expression des divers facteurs de virulence associés aux lésions A/E et au phénotype LA (Zhu *et al.* 1994). Il contient une région de 11,5 kb contenant l'opéron *bfp* (Tobe *et al.* 1999). Cette région renferme 14 gènes, incluant *bfpA* et treize autres gènes nécessaires à la synthèse et au fonctionnement du Bundle-forming pilus (BFP) (Donnenberg *et al.*

1992; Sohel *et al.* 1993; Bieber *et al.* 1998). Selon plusieurs études utilisant des volontaires sains, les souches EAF-positives démontrent une plus grande virulence que les souches dépourvues du plasmide EAF (Frankel *et al.* 1998a). Il a été démontré que les EPEC ingérés par voie orale ont besoin du EAF pour infecter des volontaires sains humains (Baldini *et al.* 1983; Levine *et al.* 1985; Nataro *et al.* 1985; Nataro *et al.* 1987; Donnenberg *et al.* 1992; Tobe *et al.* 1999).

4.2.2.1 Le système de gènes *bfp*

Le système *bfp*, ensemble de 14 gènes (Sohel *et al.* 1996; Stone *et al.* 1996) compris sur une portion de 11,5 kb du plasmide EAF (Donnenberg *et al.* 1997a; Frankel *et al.* 1998a), code pour un pilus de type IV, le BFP. En plus des gènes contenus sur ce plasmide, la formation d'un BFP fonctionnel requiert la présence du gène chromosomique *dsbA*. Ce gène code pour DsbA, une oxydoréductase périplasmique nécessaire à la formation de ponts disulfures permettant le repliement de plusieurs protéines chez diverses bactéries, telle *E. coli*, *Vibrio cholerae* et *Pseudomonas aeruginosa* (Kadokura *et al.* 2003). Le gène *bfpA* code pour la sous-unité majeure du pilus et d'autres gènes *bfp* code pour des protéines similaires à celles impliquées dans la synthèse des autres pili de type IV (Frankel *et al.* 1998a).

Le BFP participe à l'adhérence des EPEC aux cellules HEp-2 (Girón *et al.* 1991) et Caco-2 (Cleary *et al.* 2004) *in vitro*. Sa présence est une caractéristique importante des EPEC « typiques » mais il est absent des souches EPEC « atypiques », des EPEC porcines (Girón *et al.* 1992) et des STEC, suggérant que les STEC proviennent de souches EPEC EAF-négatif (Frankel *et al.* 1998a). Plusieurs études utilisant des cellules en culture d'origine extra-intestinale, de même que des lignées plus spécialisées telle Caco-2 (Cleary *et al.* 2004), ont démontré l'implication du BFP dans l'adhérence initiale des EPEC (Girón *et al.* 1991; Frankel *et al.* 1998a). L'expression du BFP est régulée par la phase de croissance bactérienne, la température et la présence d'ions calcium et ammonium (Frankel *et al.* 1998a). La

transcription du gène *bfpA* est régulée par les gènes *bfpTVW*, aussi connus sous le nom *perABC* décrit par Gomez-Duarte et Kaper en 1995 (Gomez-Duarte et Kaper 1995; Frankel *et al.* 1998a). Les gènes *bfpTVW* sont situés en aval de l'opéron *bfp* sur le plasmide EAF (Gomez-Duarte et Kaper 1995; Tobe *et al.* 1996). En IVOC, il a été démontré que des adhésines autres que le BFP ont la capacité d'initier la colonisation de la muqueuse intestinale de l'intestin grêle, et que le BFP permettrait la formation de microcolonies en 3-D via des interactions interbactériennes (Frankel *et al.* 1998a; Hicks *et al.* 1998). Les souches EPEC ne possédant pas le plasmide EAF ou n'ayant pas un gène *bfpA* fonctionnel peuvent tout de même infecter la muqueuse intestinale mais sont incapables de former des micro-colonies (Frankel *et al.* 1998a). Des études utilisant des mutants $\Delta bfpF$ incapables de former des microcolonies ont démontré que ces mutants étaient brimés dans la capacité de causer la diarrhée chez des volontaires sains (Bieber *et al.* 1998; Frankel *et al.* 1998a). Les mutants EPEC Δbfp ne peuvent plus adhérer aux cellules épithéliales (Donnenberg *et al.* 1992; Soheli *et al.* 1996; Stone *et al.* 1996; Tobe *et al.* 1999) et s'avèrent moins virulents lorsque injectés à des volontaires sains humains (Bieber *et al.* 1998; Tobe *et al.* 1999). De plus, il semble exister une corrélation entre l'expression du BFP et l'apoptose *in vitro* (Abul-Milh *et al.* 2001).

4.2.2.2 Les gènes de la région *per/bfpTVW*

Les gènes *per* (plasmid encoded regulator) A à D se retrouvent sur le plasmide EAF des EPEC typiques (Gomez-Duarte et Kaper 1995; Neves *et al.* 1998). Ces gènes agissent comme des activateurs de la transcription des gènes *eae* et *espB* (Zhu *et al.* 1994; Gomez-Duarte et Kaper 1995; Frankel *et al.* 1998a).

Les gènes *per* régulent aussi l'expression du BFP (Neves *et al.* 1998). Plusieurs gènes sur le locus LEE des EPEC sont régulés *in trans* par les activateurs de transcription *Per* codés par un ensemble de 3 ORFs appelés *perA*, *perB* et *perC* (Gomez-Duarte et Kaper 1995; Frankel *et al.* 1998a). La protéine *PerA* appartient à la

famille de régulateurs AraC et les 3 ORFs sont requis pour une pleine activité régulatrice (Gomez-Duarte et Kaper 1995; Frankel *et al.* 1998a). Des études ont démontré que le régulateur Per a aussi un effet sur l'activation de la transcription de certains composants du SSTT du locus LEE comme *escR* (Frankel *et al.* 1998a). De plus en plus, on croit que Per sert de régulateur global affectant la transcription des gènes chromosomiques et plasmidiques des EPEC (Donnenberg *et al.* 1997b; Frankel *et al.* 1998a) en plus de permettre aux souches EPEC de s'adapter à différentes conditions environnementales et à différentes phases de croissance (Frankel *et al.* 1998a). La régulation des gènes du locus LEE des STEC_{O157:H7} demeure inconnu étant donné que ces souches ne possèdent pas de gène *per* (Frankel *et al.* 1998a). Le gène *perC* est capable de surréguler *eae* mais l'activation de ce dernier par ce seul gène résulte en une diminution de l'expression de *eae* comparé à l'effet des trois gènes *per* simultanément (Gomez-Duarte et Kaper 1995).

4.2.3 Le gène *bipA*

Le gène *bipA* a récemment été identifié comme étant un autre régulateur potentiel de l'apparition des lésions A/E (Farris *et al.* 1998; Frankel *et al.* 1998a). Ce gène, situé à l'extérieur du locus LEE, code pour la protéine BipA, une GTPase tyrosine phosphorylée (Farris *et al.* 1998). BipA représente une nouvelle classe de facteurs de virulence mais son mécanisme d'action demeure encore inconnu (Farris *et al.* 1998).

4.2.4 Le gène *iha*

Le gène *iha* (IrgA homologue adhesin) code pour la protéine Iha (67 kDa), impliquée dans l'adhérence des souches STEC_{O157:H7} (Tarr *et al.* 2000). Iha possède

une structure unique qui la distingue des autres adhésines des souches O157:H7. Le rôle de Iha dans la colonisation des STEC A/E+ chez l'humain et l'animal, la structure et la fonction des homologues de Iha chez d'autres bactéries et les divers mécanismes impliqués dans sa régulation demeurent encore inconnus (Tarr *et al.* 2000). Il est possible que le gène *iha* ne code pas pour une adhésine, mais plutôt pour une protéine régulant de façon positive l'expression d'une adhésine, ou encore que la protéine Iha facilite l'adhérence des STEC_{O157:H7} à l'épithélium gastro-intestinal de certains animaux (Tarr *et al.* 2000).

4.2.5 Les gènes *efa1/lifA* et *toxB*

Récemment, Nicholls *et al.* (Nicholls *et al.* 2000) ont identifié le gène *efa1* (*E. coli* factor for adherence) impliqué dans l'adhérence d'une souche clinique STEC A/E+ de sérotype O111:H- *in vitro*. Ce gène code pour une protéine de 365 kDa, Efa1, détectée à la surface des bactéries lors d'infections de cellules CHO-K1 *in vitro* (Badea *et al.* 2003). L'insertion du transposon Tn*phoA* dans le gène *efa1* a démontré que le gène est fonctionnel, que la protéine Efa1 possède un domaine extracytoplasmique, et qu'il s'agit d'une protéine sécrétée (Nicholls *et al.* 2000). De plus, son absence n'influence pas le SSTT (Badea *et al.* 2003). *efa1* est de même taille et sa séquence nucléotidique est 99,9% identique à celle du gène *lifA* des EPEC.

Chez les EPEC, *lifA* confère la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes sanguins circulants chez l'humain, de même que la synthèse d'interleukine (IL)- 2, IL-4, IL-5, et d'interféron gamma (IFN- γ) (Klapproth *et al.* 2000). La lymphostatine, produit du gène *lifA*, inhibe aussi la prolifération des lymphocytes gastrointestinaux murins et humains, indiquant un rôle possible dans la modulation de l'immunité mucosale intestinale (Klapproth *et al.* 1996; Malstrom et James 1998).

Le gène *efa1/lifA* est présent non seulement chez les STEC A/E+ de sérotype O111 et chez les EPEC, mais aussi chez tous les STEC A/E+ non-O157 testés, de même que chez les pathogènes entériques *C. rodentium*, *H. alvei*, et chez les REPEC (Klapproth *et al.* 2000; Nicholls *et al.* 2000). Chez les STEC_{O157:H7}, *efa1* existe sous une forme tronquée mais fonctionnelle dans le chromosome (Tatsuno *et al.* 2000). Le gène *efa1/lifA* partage une certaine homologie avec le gène *toxB/17095*, retrouvé sur le plasmide de virulence pO157 des STEC_{O157:H7} (Klapproth *et al.* 2000; Nicholls *et al.* 2000), dont le produit ToxB semble moduler la synthèse et la sécrétion de certaines protéines du SSTT du LEE impliquées dans l'adhérence aux cellules épithéliales et la formation des lésions A/E *in vitro* (Tatsuno *et al.* 2001). Le gène *toxB* serait un homologue fonctionnel de la lymphostatine (Klapproth *et al.* 2000). *In vivo*, l'infection expérimentale de veaux âgés de 4 à 11 jours avec diverses souches STEC de sérotype O5 et O111 contenant une mutation par délétion ou insertion dans le gène *efa1*, a révélée que l'absence de *efa1* diminue la durée de l'excrétion des STEC par le bovin, de même que l'association des bactéries à l'épithélium intestinal (Stevens *et al.* 2002).

4.2.6 Le gène *ompA*

Torres et Kaper (Torres et Kaper 2003) ont récemment décrit un ORF (*ompA*) codant pour une porine de la membrane externe, OmpA, impliquée dans l'adhérence des souches STEC_{O157:H7} *in vitro*. OmpA est une composante majeure de la membrane externe impliquée principalement dans le maintien de son intégrité, en liant cette dernière à la couche de peptidoglycans (Koebnik *et al.* 2000). Cette protéine est retrouvée non seulement chez *E. coli* (Koebnik *et al.* 2000), mais aussi chez *Salmonella enteritidis* (Ochoa-Reparaz *et al.* 2004) et *S. enterica* sérovar Typhimurium (Singh *et al.* 2003), de même que chez *Porphyromonas gingivalis* (Nagano *et al.* 2005). Chez les STEC_{O157:H7}, OmpA serait régulée négativement par le produit du gène *tcdA*, puisque que la souche mutée s'est avérée hyperadhérente en

culture cellulaire. Il existe un homologue de OmpA chez *V. cholerae*, OmpU, démontrant aussi des propriétés d'adhérence (Sperandio *et al.* 1995).

4.2.7 Le gène *cif*

Le gène *cif* (cycle inhibiting factor), situé à l'extérieur du LEE sur un prophage lambdoïde, code pour une cyclomoduline, la protéine Cif, composée d'un domaine C-terminal effecteur et d'un signal de translocation N-terminal interchangeable (Charpentier et Oswald 2004). Cette protéine est présente chez la plupart des souches EPEC et STEC A/E+, mais est absente ou tronquée chez la souche STEC_{O157:H7} Sakai et chez la souche EPEC humaine E2348/69, respectivement (Marches *et al.* 2003). *In vitro*, la protéine Cif est rapidement injectée dans la cellule hôte, amenant le réarrangement du cytosquelette d'actine et l'arrêt du cycle cellulaire en phase de transition G₂/M (Marches *et al.* 2003). *In vivo*, Cif pourrait participer à l'inhibition clonale de la prolifération des lymphocytes par les EPEC et les STEC A/E+ et ainsi, contourner le système immunitaire de l'hôte. De plus, Cif pourrait altérer l'intégrité de la barrière intestinale et permettre l'entrée de pathogènes à l'intérieur de la cellule hôte (Marches *et al.* 2003).

4.2.8 Les fimbriae longs polaires

En 2002, Doughty *et al.* (Doughty *et al.* 2002) identifiaient un nouvel ensemble de gènes codant pour une adhésine apparentée aux fimbriae longs polaires (LPF) de *S. enterica* sérovar Typhimurium chez une souche STEC O113:H21 (Stx2+) ne produisant pas de lésions A/E (STEC A/E-). La région chromosomique alors identifiée comprend 4 ORFs, *lpfA* à *lpfD*, situé au même endroit que l'îlot-O #154 de la souche STEC_{O157:H7} EDL933. Des homologues à *lpfA*_{O113} furent retrouvés chez 26

des 28 souches et chez 8 des 11 souches STEC A/E- et A/E+ non-O157:H7 testées, respectivement. La délétion de la sous-unité majeure *lpfA* de la souche STEC A/E-O113:H21 a significativement diminué l'adhérence de cette souche *in vitro*, suggérant un rôle d'adhésine aux fimbriae longs polaires chez les STEC A/E-.

Un opéron fimbriaire de 6,0 kb (*lpf1*) contenant 6 ORFs (*lpfABCC'DE*) et situé entre les régions 76 et 81,5 minutes sur le chromosome de *E. coli* K-12, correspondant à l'îlot-O #141 chez EDL933, a récemment été caractérisé chez EDL933, 86-24 et AGT300, trois souches STEC_{O157:H7} (Torres *et al.* 2002). Une délétion du gène *lpfA* de ces souches n'a que légèrement réduit l'adhérence et la formation de microcolonies *in vitro*, suggérant un rôle mineur du LPF dans la formation de microcolonies. Il a été aussi démontré que l'expression des divers gènes de l'opéron *lpfABCC'DE* est induite *in vitro* en phase exponentielle. Par la suite, Torres *et al.* (Torres *et al.* 2004) ont caractérisé un second opéron fimbriaire (*lpf2*), situé dans l'îlot-O #154 du génome de la souche EDL933. Cette région contient 5 ORFs (*lpfABCDD'*), où *lpfA2* code pour la sous-unité majeure du fimbriae, *lpfB2* pour une protéine chaperonne, *lpfC2* pour une protéine chaperonne d'ancrage à la membrane externe de la bactérie, et *lpfD2-lpfD'2* pour les sous-unités mineures des fimbriae. Tel qu'observé préalablement pour le *lpf1*, il semble que le produit du *lpf2* ne joue qu'un rôle mineur dans l'adhérence des STEC *in vitro*. Néanmoins, il a été récemment démontré qu'une double mutation dans les gènes *lpfA1* et *lpfA2* de la souche STEC_{O157:H7} 86-24 réduit la colonisation, la persistance, et la quantité de lésions A/E chez le porc et le mouton, lorsque comparés à la souche sauvage (Jordan *et al.* 2004).

Newton *et al.* (Newton *et al.* 2004) ont récemment caractérisé deux ensembles de gènes *lpf* (*lpf_{R141}* et *lpf_{R154}*) chez la souche EPEC de lapin 83/39. Il s'avère que la séquence nucléotidique de *lpf_{R154}* soit identique à celle de *lpfA_{O113}*, alors que *lpf_{R141}* serait un nouveau locus codant pour un LPF chez les STEC_{O157:H7}. *In vivo* chez le lapin âgé de 4-5 semaines, *lpf_{R141}* et *lpf_{R154}* seraient impliqués dans les premières étapes de l'infection et seraient essentiels au développement de la diarrhée sévère typique aux EPEC de lapins.

4.3 Les AEEC et le quorum sensing

L'effet de quorum, ou « quorum sensing », est un mécanisme de transfert de signaux entre les bactéries via la production de molécules autoinductrices qui permettent aux bactéries de "sentir" leur propre population ainsi que les autres populations bactériennes environnantes (Sperandio *et al.* 1999; Sperandio *et al.* 2003). Cette propriété a été décrite pour la première fois en 1970 chez *Vibrio fischeri* et est maintenant retrouvé comme mécanisme de régulation d'expression des gènes chez les bactéries à Gram négatif et positif (Nealson *et al.* 1970). Brièvement, la bactérie produit un autoinducteur qui s'accumule dans le milieu environnant. Quand les molécules autoinductrices atteignent une certaine concentration, elles peuvent lier et activer une protéine régulatrice bactérienne, par exemple LuxR chez *V. fischeri*. LuxR et ses homologues influencent ensuite la transcription de certains gènes, comme l'opéron *lux* chez *V. fischeri* (Kanamaru *et al.* 2000).

L'autoinducteur synthétisé par *E. coli* n'est pas bien connu. Il a pourtant été démontré que les souches *E. coli* MG1655 et STEC_{O157:H7}, *S. typhimurium* 14028 et LT2 produisent une molécule similaire ou identique au deuxième (AI-2) autoinducteur de *Vibrio harveyi*, chez qui deux systèmes de quorum sensing cohabitent en parallèle (Surette *et al.* 1999). Il a été déterminé qu'il s'agit d'une petite molécule polaire et qui est résistante à un traitement à 80°C. La molécule est sécrétée de façon maximale en milieu de phase exponentielle et est dégradée lorsque la bactérie entre en phase stationnaire (Surette *et al.* 1999). Le gène *luxS* est impliqué dans la synthèse de l'autoinducteur chez *E. coli* et *Salmonella* et il coderait pour une protéine catalysant une étape enzymatique dans la biosynthèse de l'inducteur homologue à AI-2 de *V. harveyi* (Surette *et al.* 1999). Les protéines LuxS sont très similaires chez *V. harveyi*, *E. coli*, et *Salmonella*, et des études de complémentation ont démontré que les protéines sont interchangeable entre les différentes espèces bactériennes. L'incapacité à isoler une molécule de type homosérine lactone laisse croire que les autoinducteurs retrouvés chez ces souches ne seraient pas des molécules d'homosérine lactone, contrairement à d'autres systèmes de quorum

sensing, notamment le premier système de *V. harveyi* (Surette *et al.* 1999). De plus, la régulation de la production de l'autoinducteur est différente entre les souches pathogènes et non-pathogènes. Par exemple, les STEC_{O157:H7} produisent un autoinducteur à 30°C ou 37°C, en présence ou absence de glucose, tandis que *E. coli* K-12 ne le produit qu'en présence de certaines sources de carbone. De plus, les STEC_{O157:H7} testées produisent plus d'autoinducteur que les souches *E. coli* non-pathogènes (Surette *et al.* 1999).

La majorité des gènes encodés par le LEE seraient soumis à une régulation par le quorum sensing. Les gènes des opérons LEE1, LEE2, ainsi que *tir* et *eae* (Tir ou LEE5) des souches EPEC et STEC A/E+ sont activés directement par le quorum sensing. Le régulateur Per (retrouvé chez les EPEC seulement) serait activé indirectement par le quorum sensing (Sperandio *et al.* 1999). Récemment, un homologue du régulateur LuxR, SdiA, a été identifié comme étant un régulateur négatif de l'expression des gènes *espD* et *eae* chez les STEC_{O157:H7}. SdiA est une protéine cytoplasmique possédant un domaine de liaison à l'ADN. *sdiA* a été initialement identifiée chez *E. coli* K-12 comme un activateur transcriptionnel de l'opéron *ftsQAZ*, encodant des protéines essentielles pour la division cellulaire (Aldea *et al.* 1990; Wang *et al.* 1991). SdiA est aussi retrouvé comme un homologue de LuxR chez *S. enterica* (Ahmer *et al.* 1998; Michael *et al.* 2001). De plus, des facteurs extracellulaires retrouvés dans le milieu de culture des STEC_{O157:H7} peuvent se lier, *in vitro* et *in vivo*, à la portion N-terminale de SdiA (Kanamaru *et al.* 2000).

Le système de quorum sensing incluant LuxR semble différent de celui impliquant LuxS. Il y aurait donc deux systèmes chez les STEC_{O157:H7} qui contrôlèrent l'expression des facteurs de virulence lors de deux différentes phases de croissance. En milieu de phase exponentielle, le deuxième système de quorum sensing active les gènes du SSTT, et lorsque les cellules atteignent la phase stationnaire, l'AI-2 est dégradé mais les analogues de l'AI-1 (système impliquant SdiA) s'accumulent dans le milieu de culture, prêts à réprimer l'expression de plusieurs gènes de virulence, dont *espD* et *eae* (Kanamaru *et al.* 2000). L'identification de gènes régulés par la densité de la population bactérienne peut

sembler étonnante chez les STEC_{O157:H7} puisqu'une dose infectieuse exceptionnellement faible (<50 microorganismes) peut provoquer la maladie. La faible dose infectieuse nécessaire pourrait s'expliquer par une activation *in vivo* du SSTT des STEC A/E+ via la présence d'autoinducteurs synthétisés par la flore normale de *E. coli* dans l'intestin (Sperandio *et al.* 1999). Cette hypothèse a été vérifiée et il s'avère que le système *luxS* d'une souche STEC_{O157:H7} est capable d'utiliser un autoinducteur (AI-3) sécrétée par la flore normale intestinale, en plus de répondre aux variations d'adrénaline (ou épinéphrine) *in vitro* (Sperandio *et al.* 2003). De plus, un mutant *luxS* de la souche STEC_{O157:H7} 86-24 s'est avéré moins efficace à induire le développement de lésions A/E au niveau du côlon spiralé de porcelets axéniques de 1 jour d'âge, malgré le fait qu'il en ait conservé la capacité (Jordan *et al.* 2005).

In vivo, l'adrénaline est utilisée par les cellules eucaryotes dans le but de communiquer entre elles. Tout récemment, Vlisidou *et al.* (Vlisidou *et al.* 2004) ont démontré que l'ajout de noradrénaline (5 mM) dans le milieu de culture de la souche STEC_{O157:H7} 85-170 Nal^r augmente de façon significative la réponse inflammatoire et sécrétrice intestinale, de même que l'adhérence bactérienne et la présence de lésions A/E dans un modèle d'anses ligaturées d'iléon de bovin de 35-58 jours d'âge. Mise ensemble, ces données laissent présager une certaine communication bactérie-cellule hôte *in vivo*.

5. Autres récepteurs et tropisme de l'intimine

5.1 Les intégrines

In vitro, l'intimine a la capacité de se lier aux intégrines de type $\alpha 4\beta 1$ et $\alpha 5\beta 1$ (Frankel *et al.* 1996). Cette liaison est optimale en présence d'ions Mn^{2+} et nécessite seulement les 150 derniers acides aminés de la partie Int280 (Frankel *et al.* 1996;

Kelly *et al.* 1999). Les intégrines sont une famille de glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires ayant la capacité de transmettre des signaux à travers la membrane plasmique suite à une interaction avec divers ligands extracellulaires. À ce jour, il existe au moins 20 différents types d'intégrines, formés de neuf types de sous-unités β , et de quatorze types de sous-unités α (Alberts *et al.* 1994). Le rôle de la liaison intimine-intégrines demeure encore un mystère (Beaulieu 1992 ; Muza-Moons *et al.* 2003). Certaines observations laissent croire qu'il y aurait une interaction entre l'intimine et une portion glycosylée de la cellule-hôte, ce qui pourrait expliquer le tropisme des EPEC pour certains tissus (Kelly *et al.* 1999). Néanmoins, certaines études récentes contestent ces hypothèses, précisant l'absence de résidus acides pouvant lier le calcium, éléments nécessaires à la liaison des glucides par les lectines de type C (Luo *et al.* 2000). Les entérocytes humains ne possèdent pas d'intégrines $\beta 1$ mais les cellules M retrouvées dans l'intestin expriment des intégrines $\beta 1$ à leur surface. Ces cellules étant ciblées par l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis* (Clark *et al.* 1998), une protéine servant à l'invasion des cellules par la bactérie et partageant des similitudes importantes au niveau du site de liaison avec l'intimine des AEEC, il est donc possible qu'il y ait interaction entre l'intimine des EPEC et les cellules M de l'épithélium recouvrant les PP (Kelly *et al.* 1999).

Tout récemment, Shaw *et al.* (Shaw *et al.* 2005) ont décrit un nouveau phénotype à l'aide d'un mutant Δtir de la souche EPEC humaine E2348/69 (Kenny *et al.* 1997b). L'infection d'IVOC intestinaux humains par cette souche résulte en une adhérence réduite, mais persistante, au niveau de la muqueuse duodénale humaine, accompagnée par l'effacement local des microvillosités. Ce phénotype étant différent de celui observé suite à l'utilisation d'un mutant Δeae (CVD206) de la même souche sauvage E2348/69, ces données ajoutent des évidences de l'interaction de l'intimine α de la souche EPEC humaine E2348/69 avec un récepteur autre que le Tir, possiblement un HIR.

5.2 La nucléoline

Sinclair *et al.* (Sinclair et O'Brien 2002) ont démontré la capacité de l'intimine γ des souches STEC_{O157:H7} à lier la nucléoline des cellules HEp-2 via la partie C-terminale de son intimine γ . La nucléoline est une protéine impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et la biosynthèse des ribosomes (Ginisty *et al.* 1999). Celle-ci est surtout associée au noyau mais elle est aussi retrouvée à la surface de la cellule, servant de récepteur à plusieurs virus (Orrick *et al.* 1973; de Verdugo *et al.* 1995; Sorokina et Kleinman 1999). *In vitro*, des anticorps anti-nucléoline ont inhibé l'attachement des STEC_{O157:H7} aux cellules HEp-2 (Sinclair et O'Brien 2002). La nucléoline pourrait être impliquée dans la transmission de signaux de la surface cellulaire au noyau (Zhou *et al.* 1997), suggérant son implication dans la formation de piédestaux (Sinclair et O'Brien 2002). Une étude de liaison protéique a récemment démontré (Sinclair et O'Brien 2004) que les intimines de type α (souche EPEC humaine E2348/69), β (*C. rodentium*) et γ (souche STEC A/E+ 86-24) sont capables de lier la nucléoline avec une affinité similaire. *In vitro*, ces trois sous-types d'intimine ont pu être détectées dans le même environnement que la nucléoline à la surface de cellules HEp-2. Il semble aussi que la liaison *in vitro* de l'intimine α , β ou γ avec le récepteur Tir bloque l'interaction avec la nucléoline. Mis ensemble, ces données suggèrent que la nucléoline est impliquée dans l'adhérence bactérienne médiée par les intimines de types α , β et γ , et que le récepteur Tir et la nucléoline compétitionnent pour l'intimine.

5.3 Tropisme tissulaire et spécificité d'hôte

Possédant une activité de liaison indépendante de Tir, l'intimine serait aussi impliquée dans le tropisme tissulaire des différentes souches qui l'expriment (Frankel *et al.* 1994; Frankel *et al.* 1995; An *et al.* 1997; Deibel *et al.* 2001; Reece *et al.* 2001).

In vitro et chez le porcelet axénique (Tzipori *et al.* 1995), les souches EPEC ou STEC A/E+ exprimant l'intimine α colonisent tous les niveaux du petit intestin, contrairement aux souches EPEC ou STEC A/E+ exprimant l'intimine γ ou ε , préférant plutôt l'épithélium associé aux follicules lymphoïdes (FAE) des PP (Fitzhenry *et al.* 2003a; Fitzhenry *et al.* 2003b). Cependant, il n'est pas exclu que d'autres facteurs puissent être impliqués dans ce tropisme (Phillips et Frankel 2000; Phillips *et al.* 2000b). L'intimine contribuerait également à la spécificité d'hôte puisque qu'une souche de *C. rodentium*, exprimant normalement l'intimine β , modifiée pour produire l'intimine γ d'une souche STEC A/E+, ne peut plus coloniser l'intestin de la souris (Hartland *et al.* 2000). Ce tropisme tissulaire Tir-indépendant pourrait résulter, en partie, de la présence de résidus de tyrosine au niveau du domaine lectin-like de l'intimine (Reece *et al.* 2002).

6. Étude fonctionnelle des AEEC et réponse de l'hôte

L'approfondissement des connaissances sur les divers facteurs de virulence des AEEC, de même que le développement de nouvelles technologies, laisse maintenant entrevoir une analyse plus fonctionnelle et intégrative des divers mécanismes de virulence des AEEC, de même que des divers mécanismes cellulaires générés en réponse à une telle infection.

6.1 Analyse protéomique

Hardwidge *et al.* (Hardwidge *et al.* 2004) ont récemment publié les résultats d'une analyse protéomique visant à caractériser, *in vitro* à l'aide de cellules

intestinales polarisées Caco-2, la réponse cellulaire de l'hôte suite à une infection par la souche EPEC E2348/69 et son mutant isogénique E2348/69 Δ *escN* (SSTT-). Cette étude a permis d'identifier 3 protéines exprimées uniquement en présence de la souche sauvage E2348/69, 7 protéines exprimées uniquement en présence du mutant *escN*, 125 protéines régulées positivement par la souche sauvage, 139 protéines régulées de façon négative en absence d'un SSTT fonctionnel, et 1486 protéines non-affectées suite à l'infection par l'une ou l'autre des 2 souches. L'analyse des protéines a permis d'identifier différents effecteurs eucaryotes (Figure 8) impliqués dans la formation du piédestal typique des lésions A/E (taline, cofiline, gelsoline, etc.), le transport d'ions et la diarrhée (calpaïne-5, dipeptidylpeptidase IV, ezrine, pompe d'exportation des sels biliaires, canaux calciques Ca^{2+} -dépendants, etc.), la signalisation protéine G-dépendante (facteur d'échange de guanine Fgd1, Rho GTPase TC10), et l'immunité innée de l'hôte (collectine, ficoline, facteur antibactérien Nod2).

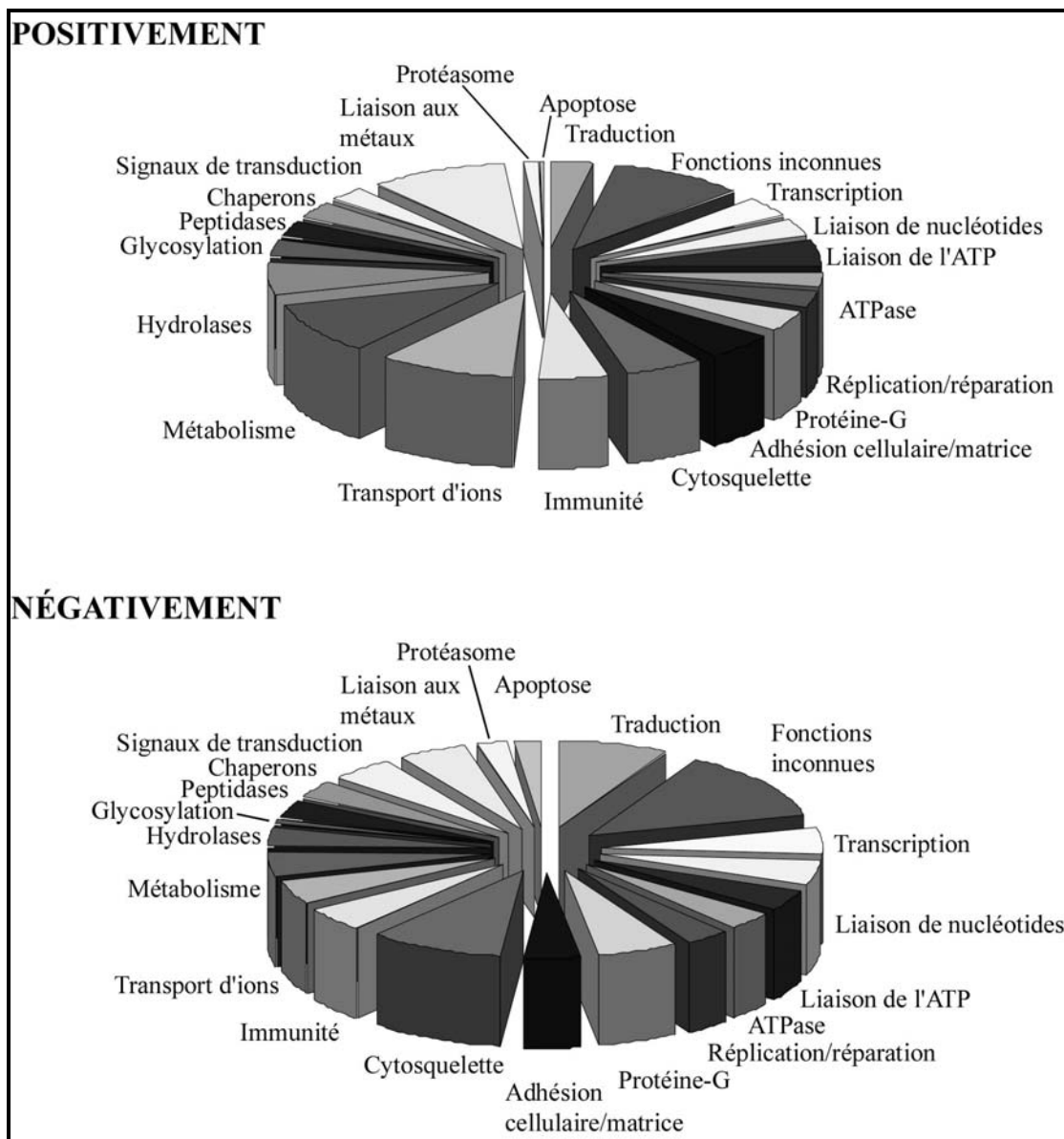


Figure 8. Classification fonctionnelle des protéines exprimées de façon différentielle (positive ou négative, suivant le ratio souche sauvage/mutant SSTT) *in vitro* lors d'une infection à EPEC. Adapté de Hardwidge *et al.*, 2004 (Hardwidge *et al.* 2004).

6.2 Analyses génétiques et transcriptionnelles

Diverses études, utilisant différentes techniques rapporteuses (puce à ADN, électrophorèse à 1 ou 2 dimensions, et « signature-tagged mutagenesis » ou mutagénèse par transposition étiquetée) ont récemment permis de mieux cibler les diverses protéines impliquées dans la pathogenèse des STEC A/E+ et des EPEC.

Dziva *et al.* (Dziva *et al.* 2004) ont ainsi identifié, par mutagénèse par transposition étiquetée, différents gènes impliqués dans la colonisation intestinale de la souche STEC_{O157:H7} EDL933 chez le veau. Les gènes identifiés ont pu être répartis en 4 grandes classes, soit les gènes associés au SSTT (*escC*, *escV*, *escN*, *sepQ* et *rorf3* entre-autres), ceux codant pour des structures de surface (*iha*, locus de l'îlot-O #84 responsable de la biosynthèse du LPS, flagelline, etc.), ceux codant pour d'autres îlot-O (*ecs2970*, impliqué dans la lyse de la cellule hôte), et les gènes de régulation (*sdiA* impliqué dans l'effet de quorum, *hrpA* codant pour une hélicase à ARN ATP-dépendante, et *ymcC* codant pour un gène impliqué dans la biosynthèse des exopolysaccharides). Mis ensemble, ces résultats apportent des précisions importantes sur les mécanismes moléculaires régissant la persistance des STEC A/E+ chez le veau.

Dahan *et al.* (Dahan *et al.* 2004) ont, pour leur part, caractérisé les changements dans l'expression des gènes d'une souche STEC_{O157:H7} suite à son adhérence à la membrane de globules rouges en utilisant une puce à ADN. Ainsi, ils ont pu identifier 299 gènes régulés négativement et 105 gènes régulés positivement suite à l'incubation avec des globules rouges. Les gènes ainsi identifiés ont pu être classés en différentes catégories, soit ceux associés à la réponse de stress, ceux associés au transport de différentes molécules à travers la membrane externe, ceux impliqués dans la traduction et la sécrétion, ceux associés au métabolisme de l'azote, ceux associés au locus LEE, de même que ceux codant pour divers régulateur.

6.3 Cinétique d'expression des facteurs de virulence des EPEC *in vitro*

Récemment, Leverton et Kaper (Leverton et Kaper 2005) ont étudié la cinétique d'expression des divers facteurs de virulence de la souche EPEC humaine E2348/69 *in vitro* sur cellules HEp-2 par RT-PCR en temps réel. Ils ont ainsi démontré que la transcription de l'opéron LEE1 (codant pour le SSTT, représenté par le régulateur *ler* dans cette étude) est réduite de 50% dans les 3 heures suivant le contact initial de la bactérie à la cellule hôte, et qu'elle demeure ainsi durant toute l'infection. À l'inverse, la transcription des opérons LEE3 (*escV*), LEE4 (*espA* et *espB*) et LEE5 (*tir* et *eae*), de même que celle du système de gènes codant pour le BFP, augmentait durant les 5 heures d'infection, et cette augmentation était corrélée par la production en continue des protéines correspondant à l'intimine, son récepteur Tir, EspA, et BfpA. L'intimine était exprimée par la plupart des bactéries après 3 heures d'infection, mais semblait très peu diminuer après 5 heures, contrastant légèrement avec les données obtenues par Knutton *et al.* (Knutton *et al.* 1997), où l'expression de l'intimine était drastiquement diminuée après 6 heures d'infection. Ces données permettent de mieux comprendre la dynamique de l'infection par les EPEC et suggèrent que cette dynamique hautement régulée est nécessaire au développement d'une infection productive *in vivo*.

7. Approches utilisées dans l'étude des mécanismes de virulence des AEEC

La capacité à induire des lésions A/E, de même que le rôle des divers facteurs de virulence des AEEC dans la pathogenèse peuvent être étudiés de plusieurs façons. Les méthodes *in vitro* incluent la culture d'organe (IVOC), l'adhérence aux diverses

lignées cellulaires, et le test de FAS. Les méthodes *in vivo* incluent principalement les infections expérimentales d'animaux de laboratoire, de même que l'inoculation d'anses intestinales ligaturées.

7.1 Les modèles d'étude *in vitro*

Les entérocytes duodénaux humains, de même que les muqueuses intestinales en culture, ou IVOC, ont largement été utilisés comme modèle d'étude de l'adhérence des EPEC (Knutton *et al.* 1987b; Knutton *et al.* 1987a), des PEPEC (Zhu *et al.* 1995b; Batisson *et al.* 2003) et des STEC_{O157:H7} (Fitzhenry *et al.* 2003a; Fitzhenry *et al.* 2003b). La culture d'organes de lapins est aussi utilisée comme modèle d'étude des divers lésions causés par les EPEC (Batt *et al.* 1987). De plus, les EPEC ont la capacité de causer des lésions A/E dans un modèle d'IVOC iléaux de lapins (Batt *et al.* 1989).

Une autre voie d'étude de la pathogenèse des infections à EPEC *in vitro* consiste en l'utilisation de lignées cellulaires de mammifères. Les EPEC ont la capacité d'adhérer aux cellules HEp-2 de façon localisée (Cravioto *et al.* 1991). De plus, l'adhérence intime et l'effacement des microvillosités peuvent être détectés avec des lignées de cellules polarisées telles CaCo-2 ou MDCK (Knutton *et al.* 1987b; Knutton *et al.* 1987a; Knutton *et al.* 1989).

Une forte concentration de filaments d'actine polymérisée a pu être observé tout près du site d'adhérence des EPEC, dans la partie apicale du cytoplasme des entérocytes humains, et de plusieurs lignées cellulaires humaines telles HEp-2 et HeLa (Knutton *et al.* 1987b; Knutton *et al.* 1987a). En se fiant à ces résultats, un test FAS a été développé comme outil diagnostique pour la détection des AEEC (Knutton *et al.* 1989). La totalité des souches EPEC humaines démontrant des changements morphologiques typiques en culture cellulaire, tel que démontré par la microscopie électronique, sont positives pour le FAS (Knutton *et al.* 1989).

7.2 Les infections expérimentales *in vivo*

7.2.1 Volontaires humains

L'utilisation de volontaires sains humains possède l'avantage de fournir un cadre bien défini et hautement contrôlé. La santé des volontaires est connue, l'inoculum est minutieusement quantifié et est administré dans un milieu bien défini, la souche utilisée est bien connue et hautement caractérisée, et les symptômes des volontaires sont facilement comptabilisés. Plusieurs infections expérimentales de volontaires humains ont été conduites afin d'étudier les manifestations cliniques dues aux EPEC. Le meilleur exemple consiste en l'étude du rôle du gène *eae* par l'utilisation de mutants *eae*- et de volontaires sains infectés par ces mutants (Donnenberg *et al.* 1993b). 11 adultes ont reçu la souche EPEC humaine E2348/69, et un nombre égal de volontaires sains ont reçu la même dose de la souche mutante *eae*- (CVD206) construite à partir de la souche E2348/69. Les 11 volontaires ayant reçu la souche sauvage E2348/69 ont développé une diarrhée, tandis que seulement 7 des 11 autres patients ayant reçu la souche mutante sont demeurés sains, la fièvre était plus commune chez les patients infectés avec la souche sauvage. Cette étude a permis de démontrer l'implication du gène *eae* et d'autres facteurs de virulence inconnus à l'époque dans la pathogénie des infections par la souche E2348/69. Le produit du gène *eae* s'est aussi révélé immunogénique chez l'humain, tel que démontré par l'apparition d'anticorps dirigés contre une OMP de 94 kDa, correspondant à l'intimine des EPEC chez des individus avec la diarrhée (Levine *et al.* 1985; Jerse et Kaper 1991).

7.2.2 Le porc

L'utilisation de porcelets nouvellement nés et d'anses intestinales ligaturées, sont deux des méthodes les plus fréquemment utilisées afin d'étudier le phénotype A/E *in vivo* chez le porc. Il a été clairement démontré que l'infection par voie orale de porcelets avec une souche EPEC humaine (Moon *et al.* 1983) ou porcine (Hélie *et al.* 1991), conduit à la dégénérescence multifocale de l'épithélium de la muqueuse intestinale, associé à la présence d'importants amas de bactéries intimement adhérentes, et à la présence de lésions A/E. Celles-ci apparaissent après seulement 1 jour d'infection et persistent sans s'accroître tout au long de l'infection (Moon *et al.* 1983). Le phénotype A/E de la souche de lapin RDEC-1 et de plusieurs souche STEC A/E+ a aussi été étudié en utilisant des porcelets nouvellement nés (Moon *et al.* 1983; Tzipori *et al.* 1989). Il a même été démontré que la prise de colostrum chez des porcelets nouvellement nés augmente l'intensité des lésions A/E retrouvées au niveau du cæcum et du côlon (Dean-Nystrom *et al.* 2000). Contrairement aux EPEC, les lésions A/E causées par la souche RDEC-1 et les STEC A/E+ sont plus fréquentes et sévères au niveau du cæcum et du côlon, plutôt qu'au niveau du petit intestin (Moon *et al.* 1983; Tzipori *et al.* 1989).

Les anses intestinales ligaturées de porc ont aussi été utilisées comme modèle afin de démontrer l'apparition des lésions A/E dues aux AEEC, tel les EPEC humains et la souche RDEC-1 de lapin (Moon *et al.* 1983). Des lésions A/E ont été observées dans des anses provenant d'intestins de porcelets âgés d'une semaine, tandis qu'aucune lésion A/E n'a été détecté dans des anses intestinales provenant de porcelets âgés de 8 semaines. Néanmoins, les lésions observées dans les anses intestinales ligaturées étaient moins intenses et sévères que celles retrouvées au niveau du petit intestin de porcelets infectés oralement (Moon *et al.* 1983).

7.2.3 Le lapin

La souche RDEC-1 a souvent été utilisée comme modèle, puisque les EPEC n'ont pas la capacité d'infecter les lapins et les rongeurs en général. La souche RDEC-1 cause de la diarrhée chez les lapins sevrés, de même que des changements histologiques similaires à ceux induits par les EPEC, soit des lésions A/E sur la muqueuse intestinale (Takeuchi *et al.* 1978). De plus, il a été démontré que le lapin est un modèle efficace afin d'étudier l'expression du phénotype A/E des STEC de différents sérotypes (Sherman *et al.* 1988). Les souches STEC A/E+ adhèrent à la partie distale du petit intestin, d'une façon morphologiquement similaire à celle observée normalement au niveau du cæcum et du côlon. L'adhérence bactérienne était aussi accompagnée d'effacement des microvillosités adjacentes au site d'adhérence, de même que de structures en piédestal (Sherman *et al.* 1988). Des études utilisant des lapins infectés oralement par *H. alvei* ont aussi démontré que la diarrhée se développe en 4 jours et dure 3 jours, pendant lesquels *H. alvei* est le seul microorganisme isolé des fèces des lapins infectés expérimentalement (Albert *et al.* 1991). L'examen microscopique a révélé des zones mucosales hyperhémiques, œdémateuses, présentant l'effacement des microvillosités, de la nécrose cellulaire, et la desquamation de l'épithélium au pôle apical des villosités (Albert *et al.* 1991).

Des variations dans l'intensité et la fréquence d'apparition des lésions A/E ont été observées, en utilisant des anses intestinales ligaturées de lapins âgés de 9 semaines infectées avec différentes souches EPEC (Moon *et al.* 1983). Par exemple, certaines souches EPEC, telle la souche E2348/69, causent des lésions aussi intenses que celles induites par la souche de lapin RDEC-1, tandis que d'autres souches EPEC en sont incapables dans ce modèle (Moon *et al.* 1983). Une étude de 1997 rapporte l'efficacité du modèle d'anses intestinales ligaturées de lapins pour l'étude de souches AEEC bovines (China *et al.* 1997). Dans cette étude, l'examen microscopique des anses infectées par des isolats bovins *eae*-positif a confirmé la présence de microvillosités effacées, l'adhérence bactérienne intime aux cellules épithéliales intestinales, et la possibilité d'internalisation des bactéries attachées.

7.2.4 Le veau

Des veaux privés de colostrum âgés de moins de 12 heures, ainsi que des veaux de plus de 3 semaines ont été utilisés afin d'étudier l'activité A/E de différentes souches STEC d'origine bovine. Les isolats STEC A/E+ bovins causent la diarrhée et induisent des lésions A/E chez des veaux de plus de 3 semaines d'âge infectés expérimentalement (Moxley et Francis 1986). De façon similaire, des veaux privés de colostrum infectés avec des isolats STEC d'origine bovine, développent de la diarrhée, de l'œdème au niveau du côlon, et montrent des lésions A/E au niveau du rectum, du cæcum, du côlon et de l'iléon, à 18 heures post-infection (Dean-Nystrom *et al.* 1997b).

7.2.5 Le poulet

Un modèle aviaire a été développé afin d'étudier la pathogénie des AEEC (Sueyoshi *et al.* 1997). Dans cette étude, des poulets âgés d'un jour ont été infectés avec des souches AEEC provenant de veaux, de porcs, de poulets ou d'humains. Les lésions A/E étaient présentes sur la muqueuse intestinale de 9 heures à 3 semaines après l'infection expérimentale. De sévères lésions A/E ont été observées au niveau de la muqueuse du cæcum de poules nécropsiées de 5 jours à 2 semaines après l'infection. Ces lésions étaient accompagnées d'une infiltration de leucocytes dans la *lamina propria* et dans la couche de tissu épithélial de 1 jour à 3 semaines après infection. L'apparition de nodules lymphatiques dans la *lamina propria* a aussi été rapportée.

7.2.6 Le singe

Un modèle d'étude des STEC_{O157:H7} a été développé chez le singe (Kang *et al.* 2001). Dans ce modèle, la souche STEC A/E+ 84-01 a pu coloniser l'intestin et induire la diarrhée chez 17 des 22 singes utilisés, et former des lésions A/E au niveau du cæcum et du colon après seulement 12 heures d'infection.

8. Les souches EPEC porcines (PEPEC)

Il existe plusieurs rapports concernant des cas d'infections naturelles à AEEC chez le porc. Ces cas sont, soit diagnostiqués par microscopie optique (Janke *et al.* 1989), soit par microscopie optique combinée à la microscopie électronique (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1994; Higgins *et al.* 1997). Le sérotype O45 d'*E. coli* est souvent isolé de cas de diarrhée post-sevrage chez le porc, et des lésions A/E ont été observées dans plusieurs de ces cas (Hélie *et al.* 1991). Il a été démontré que la plupart des isolats porcins de sérotype O45 sont capables d'induire la formation de lésions A/E *in vitro* et *in vivo*, et que ces lésions sont similaires à celles retrouvées dans des cas d'infections naturelles et dans le cas d'infections à EPEC chez l'humain (Law 1994; Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b). La capacité des isolats porcins de sérotype O45 à causer des lésions A/E est associée à la présence du gène *eae* codant pour l'intimine, mais pas à la présence du système de gènes *bfp* (Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b; Zhu *et al.* 1996).

8.1 Les facteurs de virulence associés aux PEPEC

La caractérisation phénotypique et génotypique des souches PEPEC a démontré que ces souches ne possèdent pas de facteurs de virulence associés aux souches ETEC (Sussman 1985; Zhu *et al.* 1994), sont généralement Stx négatif (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1994; Higgins *et al.* 1997), possèdent le LEE (An *et al.* 2000) et sont *bfpA*-négatifs. Cette différence les distingue des EPEC typiques (Zhu *et al.* 1994).

Une analyse des plasmides a révélé que toutes les souches PEPEC contiennent plusieurs plasmides de haut poids moléculaire, de même que plusieurs plasmides de faible poids moléculaire. Certains de ces plasmides ont une homologie de séquence avec le plasmide pHS2, un plasmide de 3 kb originalement isolé chez *S. flexneri* (Beaudry *et al.* 1996).

8.2 Les lésions A/E associées aux PEPEC *in vivo*

La plupart des PEPEC sont capables d'induire la formation de lésions A/E dans le tractus intestinal de porcelets axéniques nouvellement nés. Les lésions A/E induites par les PEPEC sont identiques à celles observées suite à l'infection de porcelets axéniques avec des souches EPEC humaines (Tzipori *et al.* 1985; Zhu *et al.* 1994). Par ailleurs, l'apparition des lésions A/E par les PEPEC inclut une étape d'adhérence initiale non-intime de la bactérie avec les cellules de la bordure en brosse, suivie par l'adhérence intime et de l'effacement des microvillosités. Les bactéries sont irrégulièrement disposées lors de l'adhérence initiale, alors qu'elles deviennent orientées lors de l'adhérence intime. À cette étape, les bactéries forment des foyers d'adhérence en palissades, et l'espace séparant les bactéries du pôle apical des entérocytes n'est plus que de 10 nm (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1994).

Tout comme dans le cas d'infection à EPEC, la sévérité et l'étendue des lésions A/E est étroitement associée à l'apparition de diarrhée chez les porcelets axéniques (Zhu *et al.* 1994). La perte drastique des microvillosités, en association avec la sévère destruction des entérocytes, contribuerait directement à la malabsorption et à l'apparition d'une diarrhée par débalancement osmotique (Tzipori *et al.* 1986; Tzipori *et al.* 1989).

8.3 Les lésions A/E associées aux PEPEC en IVOC

Un modèle IVOC utilisant des segments d'iléons de porcelets nouvellement nés a été développé afin d'étudier l'apparition des lésions A/E par les PEPEC (Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b). L'adhérence intime classique, de même que l'effacement des microvillosités et l'apparition de structures en piédestal, peuvent être observés dans ce modèle. L'utilisation d'un tel modèle a permis de démontrer que la plupart des PEPEC *eae*-positif induisent des lésions A/E, tandis qu'aucun isolat *eae*-négatif n'en induit (Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b). De plus, certains isolats PEPEC *eae*-positif démontrent plus de virulence que d'autres, suggérant l'implication d'autres facteurs de virulence présents dans certaines souches, dans l'induction des lésions A/E. De la même façon, certains facteurs de virulence peuvent être présents dans tous les isolats, mais seraient régulés négativement dans certains isolats, et régulés positivement dans d'autres.

8.4 L'adhérence des PEPEC

La plupart des isolats PEPEC *eae*-positif isolés de cas de diarrhée post-sevrage chez le porc induisent des lésions A/E *in vivo* et dans le modèle IVOC, bien qu'ils ne possèdent pas le système de gènes *bfp*, et qu'ils n'adhèrent pas de façon

localisée *in vitro* comme dans le cas des EPEC (Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b). Il est possible que les PEPEC possèdent des fimbriae ou des facteurs d'adhérence fonctionnellement similaires au BFP, mais que ceux-ci ne reconnaissent pas de récepteurs potentiels sur les lignées cellulaires telles les cellules HEp-2. Ces fimbriae ou facteurs d'adhérence spécifiques à certains récepteurs propres au porc pourraient être impliqués dans l'adhérence initiale des PEPEC sur les entérocytes de la muqueuse intestinale, et ainsi permettre l'adhérence intime et l'effacement des microvillosités. La capacité de la souche PEPEC ECL1001 (originellement désignée P86-1390) à adhérer d'une façon diffuse aux cellules HEp-2 a été observée qu'après l'ajout d'un plasmide codant pour l'adhésine afimbriaire Afa (Beaudry *et al.* 1996).

8.5 L'intimine des PEPEC

Une OMP de 97 kDa a été identifiée chez les PEPEC et son poids moléculaire, la séquence en acides aminés de sa partie N-terminale, de même que sa similarité antigénique ont permis de conclure qu'il s'agit bel et bien de l'intimine (Zhu *et al.* 1995a; Zhu *et al.* 1995b; An *et al.* 2000). La séquence protéique de sa partie N-terminale a démontré que le premier acide aminé de l'intimine des PEPEC correspond au 40^{ème} acide aminé (asparagine) de l'intimine des EPEC et des STEC A/E+ (Zhu *et al.* 1995a). Il a été démontré que les intimines des souches PEPEC sont antigéniquement similaires, suite à l'utilisation d'antisérums contre la bactérie entière et contre l'intimine (Zhu *et al.* 1995a). De plus, l'étroite relation entre l'intimine des PEPEC et celle de la souche de lapin RDEC-1 a été démontrée par l'analyse des OMP par immunobuvardage à l'aide d'un antisérum polyclonal. À l'inverse, l'intimine des PEPEC semble partager peu de similarité avec celle des EPEC. Des variations quantitatives de la production de l'intimine des PEPEC ont été démontrées à l'aide de l'ELISA. De plus, il existerait une corrélation entre la quantité d'intimine exprimée et la sévérité des lésions A/E induites par les PEPEC *in vivo* (Zhu *et al.* 1995a). Ceci

pourrait indiquer que la quantité d'intimine produite détermine la sévérité et l'étendue des lésions A/E *in vivo*.

8.6 Le facteur Paa

Récemment, un nouveau facteur de virulence a été caractérisé chez la souche PEPEC ECL1001 de sérotype O45 :H- (An *et al.* 1999a). L'insertion a été identifiée dans un gène désigné *paa* (porcine attaching-effacing associated gene). L'analyse des séquences de *paa* a révélé un ORF de 753 pb codant pour une protéine d'environ 27,6 kDa (251 acides aminés), partageant 100%, 51,8% et 49% d'homologie avec le gène *paa* des souches STEC_{O157:H7} EDL933 et Sakai, avec la protéine PEB3 de *Campylobacter jejuni* et la protéine AcfC de *V. cholerae*, respectivement. La localisation chromosomique a démontré que la région contenant le gène *paa* est insérée entre les gènes *yciD* et *yciE*, à environ 28,3 minutes sur le chromosome d'*E. coli* K-12. La présence des gènes *paa* et *eae* chez la souche ECL1001 est hautement associée au phénotype A/E (Batisson *et al.* 2003). L'insertion du transposon *TnphoA* dans le gène *paa* de la souche PEPEC ECL1001, de même que la délétion chromosomique du gène *paa* de la souche REPEC E22, a significativement diminué l'adhérence de ces souches dans un modèle IVOC chez le porcelet, alors que leur complémentation en *trans* du gène *paa* a ramené leur pleine capacité à adhérer (Batisson *et al.* 2003). L'utilisation d'anticorps anti-Paa a considérablement réduit l'adhérence de la souche PEPEC ECL1001, et l'utilisation d'anticorps couplés à des billes d'or a démontré une distribution uniforme de la protéine Paa à la surface de la souche ECL1001. Tout ceci suggère que Paa pourrait avoir un rôle dans l'adhérence initiale des PEPEC et, conséquemment, retarder l'apparition des lésions A/E.

9. Les AEEC et le système immunitaire

9.1 Modulations immunitaires

Plusieurs études récentes ont démontré l'implication du système immunitaire de l'hôte dans le processus pathologique associé aux AEEC. L'avancement des connaissances dans le domaine, conjugué au développement de nouvelles techniques et modèles d'études, a permis d'identifier divers intervenants de l'hôte participant à la réponse de l'hôte face aux AEEC.

9.1.1 Études *in vitro*

In vitro, l'intimine des EPEC possède la capacité de se lier à différentes cellules, dont environ 75% des lymphocytes T CD4⁺, principalement ceux de la rate, des nœuds lymphatiques et des plaques de Peyer (Goncalves *et al.* 2003). De plus, l'intimine des EPEC ne semble pas avoir d'affinité pour les lymphocytes T de la *lamina propria*, de même que les lymphocytes intraépithéliaux. Malgré l'affinité de l'intimine pour certaines cellules du système immunitaire, les conséquences physiologiques ou pathologiques en découlant demeurent inconnues.

Du point de vue cellulaire, les infections à EPEC affectent la synthèse et le relargage de cytokines par les tissus de l'hôte. *In vitro*, il a été démontré que les EPEC induisent la transmigration IL-8-dépendante, mais LPS-indépendante, des neutrophiles circulants (Savkovic *et al.* 1996), et que cette synthèse d'IL-8 est dépendante du facteur nucléaire NF- κ B, lui-même activé, en début d'infection, par les EPEC d'une façon EspB-dépendante, mais indépendante de l'adhérence intime (Savkovic *et al.* 1997; Hecht *et al.* 1999). Une investigation plus poussée a démontré qu'une infection persistante à EPEC ou STEC A/E+ résulte en une diminution EspB-

dépendante de NF- κ B, accompagnée d'une diminution d'IL-6 et d'IL-8 (Hauf et Chakraborty 2003). Les EPEC ont aussi la capacité, *in vitro*, d'inhiber la production et le relargage de l'IL-2 et l'IL-4 par les lymphocytes intestinaux et spléniques (Malstrom et James 1998). Cet effet est indépendant des facteurs EspA et EspB, mais l'élément responsable de cette inhibition est toujours inconnu. *In vitro*, les EPEC induisent la migration des neutrophiles à travers l'épithélium intestinal, sans pour autant affecter les jonctions serrées et la conductance transépithéliale (Michail *et al.* 2003).

Récemment (Ceponis *et al.* 2003), il a été démontré que les STEC_{O157:H7}, mais pas les EPEC, peuvent, *in vitro* en culture de cellules épithéliales humaines HEp-2 et T84, altérer la voie de transduction de l'IFN- γ médiée par le système de protéines cytoplasmiques Stat1. L'IFN- γ est une cytokine jouant un rôle critique dans la défense de l'hôte (Shtrichman et Samuel 2001) et sa production est positivement régulée chez la souris lors d'infections expérimentales à EPEC (Higgins *et al.* 1999b) et à *C. rodentium* (Higgins *et al.* 1999b; Higgins *et al.* 1999a), de même que lors d'infections expérimentales chez l'humain (Tacket *et al.* 2000). Plusieurs cytokines, dont l'IFN- γ , sont à la source de signaux de transduction intracellulaire via la cascade de transduction Jak/Stat (Janus kinase-signal transducer and activator of transcription) (Ihle 2001). Suite à la stimulation des chaînes 1 et 2 du récepteur à l'IFN- γ à la surface des cellules, les protéines associées Jak1 et Jak2 phosphorylent spécifiquement certains résidus de tyrosine retrouvés sur le domaine cytoplasmique des récepteurs. Par la suite, la phosphorylation de Stat-1 par Jak2 permet la dimérisation de Stat1, sa translocation vers le noyau de la cellule, enclenchant la transcription suite à sa liaison via des séquences spécifiques d'ADN dans les promoteurs de certains gènes importants pour la défense de la cellule face aux différents agents pathogènes (Ramana *et al.* 2000).

9.1.2 Études *in vivo*

Du point de vue humoral, deux études (Li *et al.* 2000; Karpman *et al.* 2002) utilisant des sérums d'enfants infectés naturellement par une souche STEC_{O157:H7} ont démontré qu'un haut titre d'anticorps dirigés contre l'intimine, Tir, EspA et EspB est détectable jusqu'à 60 jours après leur hospitalisation. Le titre associé à Tir demeurait très élevé chez les patients ayant développé le SHU, principale complication associée aux cas d'infections à STEC_{O157:H7}. Une autre étude (Tacket *et al.* 2000) ayant comme objectif de démontrer l'importance de EspB dans la pathogénicité des AEEC a permis de révéler l'implication d'une réponse humorale et lymphoproliférative contre EspB.

Ramirez *et al.* (Ramirez *et al.* 2005) ont récemment caractérisé la réponse proinflammatoire induite par la souche REPEC E22 (O103:K-H2) et ses mutants E22 Δ *eae* et E22 Δ *espA* *in vivo* chez le lapin. Ainsi, ils ont démontré une augmentation importante de l'ARNm de l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et du TNF- α au niveau des cellules épithéliales suite à une infection avec la souche sauvage, alors que les mutants E22 Δ *eae* et E22 Δ *espA* n'induisaient qu'une augmentation d'IL-10 ou d'IL-8 et de TNF- α , respectivement. L'importance des lymphocytes des PP dans le développement de la réponse cytokinaire proinflammatoire aussi été démontrée. Mis ensemble, les résultats de cette étude ont démontré que le développement de la réponse cytokinaire proinflammatoire est dépendant de la présense de l'intimine, et les auteurs ont suggéré que cette réponse pourrait être impliquée dans le déclenchement de la diarrhée propre aux REPEC.

Tout récemment, Isogai *et al.* (Isogai *et al.* 2001) ont démontré que l'administration de TNF- α à des souris infectées expérimentalement avec une souche STEC_{O157:H7} produisant les toxines Stx1 et Stx2 augmente la sévérité des symptômes neurologiques et rénaux associés à ce type d'infection, suggérant un synergisme potentiel entre la production de TNF- α (en réponse à l'infection) et la production de toxines Stx (par la bactérie). Ces données sont appuyées par le fait que

l'administration de TNF- α stimule (10 à 100 fois) la biosynthèse des récepteurs à toxines Stx au niveau des cellules de l'endothélium vasculaire chez l'humain, augmentant ainsi la sensibilité des cellules aux toxines Stx (van de Kar *et al.* 1992).

Chez *C. rodentium*, il a été démontré que les lymphocytes T et B (Vallance *et al.* 2002a; Simmons *et al.* 2003), de même que l'expression de l'oxyde nitrique synthase inductible (iNOS) (Vallance *et al.* 2002b), sont importants dans la résistance à la colonisation menant au développement des lésions A/E chez la souris. A priori, la synthèse et la sécrétion des immunoglobulines IgA et/ou IgM ne semblent pas être impliquées dans la résistance de l'hôte (Maaser *et al.* 2004). De plus, l'injection de cellules bactériennes mortes de *C. rodentium* dans la lumière du côlon amène le déclenchement d'une réponse mucosale Th1 au niveau de la *lamina propria*, identique à celle retrouvée lors d'infections expérimentales (Higgins *et al.* 1999b; Higgins *et al.* 1999a). Cette activité résiduelle pourrait être due à l'intimine (Goncalves *et al.* 2003). Récemment, Simmons *et al.* (Simmons *et al.* 2002) a démontré que l'IL-12 et l'IFN- γ , et possiblement les β -défensines inductibles de type mBD3, occupent un rôle important dans la résistance à la colonisation et la sévérité de la pathologie associée à *C. rodentium* chez la souris. Les défensines sont un groupe de peptides antimicrobiens sécrétés par de multiples cellules, incluant les neutrophiles, les macrophages et les cellules épithéliales de plusieurs organes. Au niveau intestinal, les α -défensines sont surtout synthétisées par les cellules de Paneth, alors que les β -défensines sont surtout synthétisées par les cellules épithéliales (Simmons *et al.* 2002). Les défensines exercent une activité antimicrobienne versus les bactéries à Gram positif et à Gram négatif, incluant *E. coli*, *S. enterica* sérovar Typhimurium et *Listeria monocytogenes* (Simmons *et al.* 2002).

D'autres mécanismes généraux semblent impliqués dans la résistance à la colonisation des souches EPEC. *In vitro*, il a été démontré que le peptide amyloïde du sérum humain A3 augmente l'expression de la protéine intestinale MUC3, inhibant l'adhérence des EPEC (Larson *et al.* 2003). Les mucines intestinales sont responsables de l'élimination des particules bactériennes et virales par encombrement stérique ou par liaison spécifique (Larson *et al.* 2003). De plus, il a été démontré que

la lactoferrine, une glycoprotéine liant le fer aux nombreuses propriétés physiologiques, antimicrobiennes, anti-inflammatoires, et immunomodulatrices, présente dans les granules spécifiques des neutrophiles, dans le lait et d'autres sécrétions muqueuses (larmes, salive, sécrétions vaginales), est capable de bloquer la polymérisation de l'actine en culture de cellules HEp-2, de même que certaines propriétés hémolytique des EPEC (Ochoa *et al.* 2003). Ces modifications font suite à la dégradation de certains facteurs de virulence du SSTT des EPEC nécessaires à l'adhérence et à la formation de pores par la lactoferrine, en particulier le facteur EspB. *In vitro*, cette dégradation peut être évitée par l'ajout d'inhibiteurs de sérines protéases (Ochoa *et al.* 2003). Il a aussi été démontré que l' α_1 -antitrypsine (AAT), une protéine de la phase aiguë et l'inhibiteur de protéases à sérines le plus abondamment retrouvé dans le sérum, lie la protéine EspB des EPEC, réduisant ainsi l'hémolyse des globules rouges et la polymérisation de l'actine médiées par la souche EPEC humaine E2348/69 (Knappstein *et al.* 2004). *In vitro*, l'hémolyse des globules rouges par les EPEC (typique et atypiques) se fait indépendamment d'un contact bactérie-globule rouge, mais est étroitement lié à la présence des protéines EspB et EspD dans le surnageant de culture (Warawa *et al.* 1999; Ide *et al.* 2001). Tout comme d'autres composants du système immunitaire inné, l'AAT pourrait être impliqué dans la défense de l'hôte face aux diverses protéines sécrétées par le SSTT des EPEC. Puisque aucun motif protéase n'a pu être identifié jusqu'à présent sur EspB, il semblerait que l'interaction de l'AAT et EspB se fasse sur un autre domaine. Une interaction EspB-AAT intracellulaire n'est pas exclue mais reste à être démontrée (Knappstein *et al.* 2004).

9.2 Les stratégies thérapeutiques contre les AEEC

Outre l'administration d'antibiotiques, la vaccination s'avère une avenue prometteuse en ce qui concerne la prévention des infections à AEEC, tant chez l'humain que chez les autres espèces animales.

9.2.1 La vaccination

Parmi tous les candidats proposés, l'intimine des EPEC et des STEC A/E+ représente une cible de choix dans l'élaboration de vaccins et de stratégies immunoprophylactiques. En plus d'être absolument nécessaire dans le développement des lésions A/E (Zhu *et al.* 1994), il a été démontré qu'une réponse humorale importante est développée en réponse à une stimulation du système immunitaire de l'hôte par l'intimine, tant chez l'humain (Li *et al.* 2000) que chez la souris suite à une infection expérimentale à *C. rodentium* (Ghaem-Maghami *et al.* 2001; Simmons *et al.* 2003). Ainsi, Dean-Nystrom *et al.* (Dean-Nystrom *et al.* 2002) ont démontré qu'une préparation vaccinale composée de l'intimine provenant d'une souche STEC_{O157:H7} (intimine_{O157}), combinée à un adjuvant, administrée par voie parentérale 4 semaines et 2 semaines avant la mise-bas, amène une réponse humorale chez la truie. De plus, l'ingestion des anticorps anti-intimine_{O157} via le lait maternel s'est avéré conférer un caractère protecteur contre une infection expérimentale à STEC_{O157:H7} chez le porcelet nouvellement né (Dean-Nystrom *et al.* 2002). Ces résultats définissent clairement l'intimine_{O157} comme un candidat à considérer dans le développement d'un vaccin visant la réduction de la transmission des STEC_{O157:H7} à l'humain.

Le potentiel de protéines recombinantes intimine_{O157} provenant de plantes génétiquement modifiées (Judge *et al.* 2004) à stimuler le système immunitaire intestinal a récemment été vérifié chez la souris. Les résultats ont démontré un effet significatif à réduire la colonisation d'une souche STEC_{O157:H7} suite à l'administration parentérale de protéine intimine_{O157}, suivi d'une dose de rappel par voie orale. Néanmoins, la vaccination orale, à elle seule, s'est avérée statistiquement inefficace dans le même modèle animal (Judge *et al.* 2004). En résumé, il semble que l'utilisation de plantes génétiquement modifiées produisant la protéine intimine_{O157} soit une avenue envisageable dans la réduction de la présence de souches STEC_{O157:H7} chez les bovins, réduisant du même coup les risques de contamination pour l'humain.

Outre l'intimine, certaines protéines sécrétées par le SSTT, dont EspA, EspB et EspD, ont récemment fait l'objet d'une étude visant à démontrer leur capacité à réduire la colonisation et l'excrétion de bactéries STEC_{O157:H7} *in vivo* chez le veau (Potter *et al.* 2004). Ainsi, la vaccination de bovins à l'aide d'une préparation de protéines sécrétées par une souche STEC_{O157:H7} a significativement réduit l'excrétion fécale des STEC_{O157:H7}, le nombre d'animaux sécrétant des STEC_{O157:H7}, de même que la durée de l'excrétion des STEC_{O157:H7}. Ceci démontre le potentiel d'un tel vaccin à réduire la transmission des STEC_{O157:H7} à l'humain.

À l'utilisation de vaccins, s'ajoute l'utilisation de souches génétiquement modifiées capable de stimuler le système immunitaire de l'hôte, tout en étant incapable d'induire le développement des lésions A/E *in vivo*. Cette possibilité a récemment été investiguée par Boullier *et al.* (Boullier *et al.* 2003). Suite à son administration par voie orale à des lapins sevrés, une souche REPEC E22ΔTir/EspB s'est avérée capable de coloniser l'épithélium intestinal, sans toutefois causer de lésions A/E, en plus de conférer un pouvoir protecteur contre une infection expérimentale par la souche REPEC E22 de sérotype O103, très virulente chez le lapin (Nougayrède *et al.* 1999).

9.2.2 Les IgY comme alternative préventive et thérapeutique

La volaille produit principalement trois classes distinctes d'immunoglobulines (Ig), *i.e.* des IgM, IgG et des IgA. Tout comme ceux des mammifères, les IgM aviaires sont principalement sécrétés sous forme de pentamères. Lorsque exprimés à la surface des lymphocytes B, ils agissent comme des récepteurs BCR ayant un complexe de signalisation similaire à celui retrouvé chez les mammifères (Sharma 1997). Les IgA aviaires sont produit en grande quantité au niveau des muqueuses et jouent un rôle critique dans la résistance aux maladies respiratoires et intestinales. Dans les sécrétions muqueuses, les IgA se présentent sous forme de dimères ou de

tétramères joints ensemble par une chaîne J alors que dans le sérum, ils se présentent sous la forme de monomères. Les IgA sont transportés vers le foie où ils sont stockés dans la bile (Sharma 1999). L'équivalent des IgE et IgD des mammifères n'a pas encore été identifié chez la volaille (Sharma 1997).

Les IgG aviaires (ou IgY) représentent la principale classe d'immunoglobulines chez la volaille (Carlander *et al.* 2000). Ils sont généralement plus longs que ceux retrouvés chez les mammifères, expliquant l'appellation IgY. Ils sont formés de deux chaînes légères (22 kDa) et de deux chaînes lourdes upsilon (υ , 66 kDa), et ont un poids moléculaire approximatif de 180 kDa (Carlander *et al.* 2000). Les IgY sont transportés de la mère à l'embryon via le jaune d'œuf, qui en accumule une quantité impressionnante. Au niveau du jaune d'œuf, la concentration en IgY dépasse largement celle du sérum, pour atteindre environs 100 mg par 15 ml (Carlander *et al.* 2000). L'utilisation du jaune d'œuf comme source d'anticorps polyclonaux représente donc une alternative de choix à l'utilisation de petits rongeurs pour la production d'anticorps et plusieurs comités européens et américains recommandent dorénavant son utilisation.

Bien que fonctionnellement similaires aux IgG des mammifères, les IgY possèdent certaines caractéristiques qui les différencient de ces derniers (Carlander *et al.* 2000). Les IgY ne possèdent pas de région charnière, suggérant qu'ils soient l'ancêtre de l'équivalent des IgG et IgE des mammifères (Sharma 1997). Les complexes immuns ont la caractéristique d'activer le complément (Carlander *et al.* 2000). Certains produits d'activation du complément sont de puissants médiateurs de l'inflammation. Les complexes immuns des mammifères peuvent donc activer certaines cellules immunitaires au niveau du tractus gastro-intestinal via les récepteurs Fc. Les IgY n'ont pas la capacité d'activer le complément et n'interagissent pas avec les récepteurs Fc. Les IgY possèdent un temps de transit gastro-intestinal de 12 à 36 heures chez les enfants. Les anticorps administrés oralement sont soumis à une dénaturation par le pH acide de l'estomac, de même qu'à un clivage enzymatique important par les protéases (Carlander *et al.* 2000). Malgré

toutes ces altérations, il a été démontré qu'une certaine partie des IgY demeure fonctionnelle et exercent toujours leur activité neutralisante via la partie Fab'₂ et Fab.

L'idée d'utiliser les anticorps IgY synthétisés chez la poule dans le but de prévenir la colonisation des bactéries pathogènes remonte au début des années 90, mais les démonstrations convaincantes de l'efficacité d'une telle stratégie sont peu nombreuses. Chez *E. coli*, néanmoins, l'utilisation d'IgY s'est révélée efficace *in vivo* contre l'apparition de la diarrhée colibacillaire porcine due aux ETEC K88+ (Marquardt *et al.* 1999) et F18+ (Imberechts *et al.* 1997). Dans les deux cas, l'utilisation d'IgY spécifiques a diminué le taux de mortalité dû aux ETEC, de même que l'incidence et la sévérité de la diarrhée retrouvée chez les porcelets infectés expérimentalement lorsque comparés à des porcelets témoins.

L'utilisation des IgY dans le traitement et la prévention des maladies infectieuses ne se limite pas à *E. coli*. L'utilisation d'IgY spécifique à l'entérotoxine B de *Staphylococcus aureus* s'est révélée efficace à limiter les effets de cette toxine chez des primates non-humains (LeClaire *et al.* 2002), tandis que l'administration d'IgY dirigés contre la protéine GBP-B de *Streptococcus mutans* réduit la formation de caries dentaires (Smith *et al.* 2001).

Une étude récente démontre l'efficacité des IgY dirigés contre *H. pylori* à réduire l'association de cette bactérie à la muqueuse gastrique en IVOC et *in vivo* chez la gerbille (Shin *et al.* 2002). De plus, les auteurs ont démontré que les IgY peuvent résister à différents pH, à la pepsine, ainsi qu'à une température de 60°C pendant 10 minutes, suggérant la possibilité d'utiliser la pasteurisation comme méthode de stérilisation de la préparation d'anticorps.

10. Immunologie du tractus gastro-intestinal porcin

10.1 Généralités

La muqueuse du tractus gastro-intestinal est en contact direct avec de nombreux antigènes, certains étant inoffensifs (nourriture) alors que d'autres sont de véritables pathogènes. Contrairement à la peau, agissant comme barrière physique à la pénétration des antigènes, l'intestin se doit d'être en contact direct avec les molécules venant de l'alimentation. Afin de se protéger contre d'éventuels agents pathogènes, l'intestin s'est muni d'un système immunitaire local très développé et hautement spécialisé lui permettant une défense adéquate en cas de besoin, le système lymphoïde gastro-intestinal (gut-associated lymphoid tissue, GALT). Les principales structures et cellules du GALT sont les cellules épithéliales, les PP, incluant les cellules M, et la *lamina propria* (Figure 9).

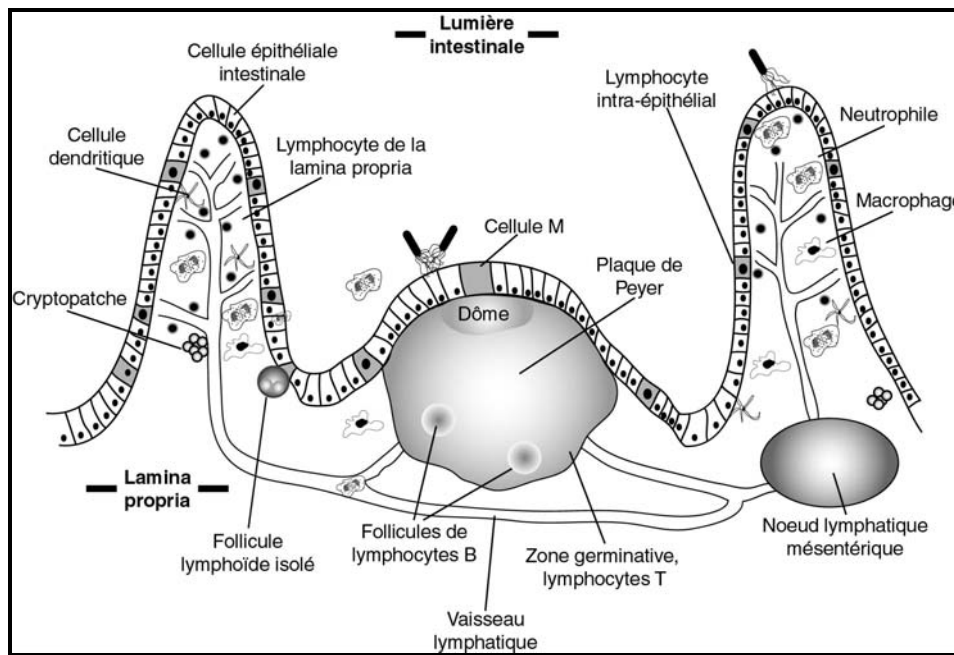


Figure 9. Survol des différents éléments du GALT des mammifères. Adapté de Spahn et Kucharzik, 2004 (Spahn et Kucharzik 2004).

10.2 Les plaques de Peyer (PP)

Les PP sont un agrégat de follicules lymphoïdes recouvert d'un lymphoépithélium spécialisé (Stokes *et al.* 1994). Suivant la stimulation antigénique, elles apparaissent à partir du 50^{ème} jour de gestation *in utero* (Bianchi et van der Heijden 1994). Chez le porc, les PP sont séparées en deux catégories bien distinctes, soit les plaques de Peyer jéjunales et iléales. Les PP jéjunales, au nombre de 25 à 35, sont distribuées le long du jéjunum et de l'iléon proximal en de tout petits amas, sont fortement cellulaires (lymphocytes B surtout) (Bianchi et van der Heijden 1994) et persistent tout au long de la vie du porcelet. Contrairement aux PP jéjunales, celles retrouvées au niveau iléo-cæcal sont très grosses (jusqu'à 2,5 m de long) et leur importance diminue après la première année de vie. Ces deux types de plaques diffèrent aussi quant à leur structure et l'activité lymphocytaire qu'on y retrouve (Stokes *et al.* 1994). Les PP connaissent une forte expansion de leur taille lors du sevrage, et celle-ci est généralement influencée par l'âge et la diversité microbienne de l'intestin. Néanmoins, le nombre demeure constant tout au long de la vie de l'animal. Le rôle exact des PP n'est pas tout à fait clair mais certains croient qu'elles seraient impliquées dans l'immunité et l'induction de la tolérance dès les premiers instants de la vie des porcelets (Bianchi et van der Heijden 1994).

Par opposition à l'agneau, les PP du porc ne semblent pas constituer un organe lymphoïde primaire pour les lymphocytes B (Bianchi et van der Heijden 1994). Elles agiraient plutôt comme organe lymphoïde secondaire, présentant un nombre de lymphocytes B 15 fois supérieur entre 1 et 42 jours d'âge. Au niveau des PP iléales chez le porc, 32 % des lymphocytes sont CD2- et ne présentent aucun marqueur propre aux lymphocytes B à leur surface (null cells) (Stokes *et al.* 1994). Chez le porcelet axénique, 20% des lymphocytes B CD2+ des plaques iléales sont CD4- et CD8-, alors que chez le porcelet conventionnel de 6 semaines d'âge, le pourcentage de cellules CD2+ est similaire à la somme des cellules CD4+ et CD8+. Chez le porcelet plus âgé, une forte proportion des lymphocytes B sont CD2+ et,

simultanément, CD4⁺ et CD8⁺. L'importance immunologique de ce type de cellules particulières reste à déterminer (Stokes *et al.* 1994).

10.3 Les cellules M

Afin de rejoindre les structures du GALT et ainsi induire une réponse immunitaire adéquate, les antigènes potentiellement pathogènes doivent franchir la barrière cellulaire formée par l'épithélium et le lymphoépithélium des PP. Cette fonction de transport est assurée par un type d'épithélium spécialisé associé aux FAE. Cet épithélium renferme un type bien particulier de cellules appelées cellules M (microfold cells, Figure 10) (Neutra *et al.* 1996; Jepson et Clark 1998). Les cellules M peuvent être distinguées des autres cellules de l'épithélium par un marquage de la cytokératine 18, élément du cytosquelette des cellules eucaryotes (Gebert *et al.* 1994).

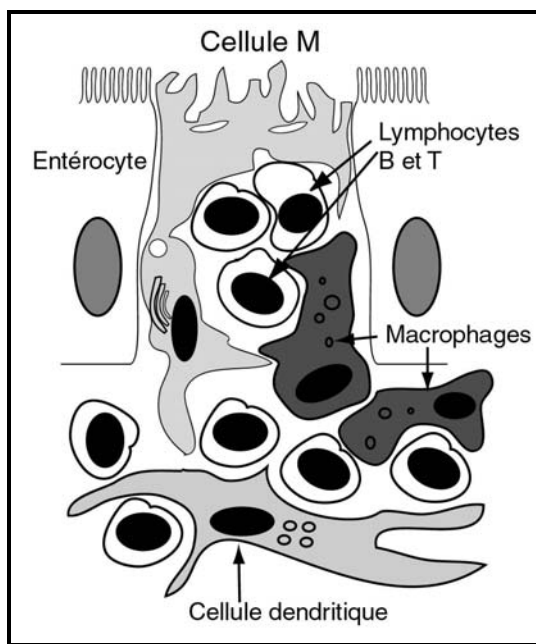


Figure 10. Diagramme d'une cellule M au niveau des plaques de Peyer. Adapté de Neutra *et al.* 1996 (Neutra *et al.* 1996).

Les cellules M sont responsables du transport de macromolécules, de particules et de microorganismes à travers l'épithélium intestinal. Ces cellules sont capables d'endocytose et de transcytose, mécanismes grandement facilités par le fait qu'elles sont dépourvues de bordure en brosse rigide, par opposition aux autres cellules de l'épithélium intestinal (Neutra *et al.* 1996). Le pôle apical renferme des repliements (siège de l'endocytose), tandis que sa membrane basolatérale est profondément invaginée et forme une « poche intraépithéliale » contenant des lymphocytes T (incluant des lymphocytes T « helper » CD4+ et des cellules T mémoires CD45RO+), des lymphocytes B et des macrophages. Cette structure réduit la distance que doivent parcourir les vésicules de transcytose à travers la cellule. L'antigène est ensuite digéré et présenté par les macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes B, amenant leur différenciation en plasmocytes et amenant la synthèse d'IgA sécrétoires.

Le transport de microorganismes pathogènes intestinaux par les cellules M semble un élément important des mécanismes de défense de l'hôte mais les mécanismes moléculaires sont encore que très peu caractérisés. Paradoxalement, certaines bactéries exploitent cette caractéristique afin d'envahir les cellules de l'hôte. C'est le cas de *Salmonella* et *Shigella*, deux pathogènes intestinaux importants. Ceux-ci utilisent les cellules M afin de pénétrer à l'intérieur de l'épithélium et exercer leur action pathogène sur l'intestin (Goosney *et al.* 1999).

10.4 L'épithélium associé aux follicules du GALT

Les follicules lymphoïdes des PP sont recouverts par un épithélium prismatique simple. Ces cellules sont produites dans les cryptes entourant les follicules et elles migrent à leur surface vers le centre, développant des caractéristiques qui leur sont propres. Bien que plus cubiques, la plupart des cellules épithéliales des follicules ressemblent aux cellules épithéliales des villosités

intestinales et présentent une bordure en brosse à leur pôle apical. Une certaine proportion de ces cellules (20-30%) sont des cellules M (Stokes *et al.* 1994). Les cellules impliquées dans l'immunité mucoale ne sont pas seulement confinées à l'intérieur des PP. Plusieurs cellules expriment les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH-II) de façon constitutive. Ces cellules sont surtout situées dans le deux-tiers supérieur des villosités, mais certaines cellules des cryptes peuvent les exprimer suite à certaines stimulations inflammatoires (Stokes *et al.* 1994).

Les lymphocytes intraépithéliaux (IEL) représentent un groupe de cellules principalement situées entre les entérocytes, séparés de la lumière intestinale par des jonctions serrées intercellulaires, et aussi de la *lamina propria* par la lame (ou membrane) basale (Stokes *et al.* 1994). Selon des études d'expression du CD2, environs 27% des cellules épithéliales porcines seraient des IEL CD2⁺ (90%), CD8⁺ (77%), et CD4⁺ (5%). Une faible proportion de IEL CD2⁺ CD8⁻ CD4⁻ est retrouvée dans la partie apicale des villosités chez les porcelets sevrés, par opposition aux porcelets nouvellement nés chez qui ce type de cellules est beaucoup plus fréquent (Stokes *et al.* 1994).

10.5 La lamina propria

La *lamina propria* des porcs est hautement cellulaire et une forte proportion des cellules qu'on y retrouve sont CD45⁺. Environ 40% de ces cellules sont CD2⁺ (lymphocytes T), les autres correspondant à des monocytes / granulocytes (Stokes *et al.* 1994). Chez le porcelet âgé de 6 mois, les lymphocytes T CD2⁺ sont plus abondants au niveau des villosités, alors que les lymphocytes B sont surtout retrouvés dans les cryptes. Les cellules IgM⁺ sont prédominantes dans les trois premières semaines de la vie du porcelet, mais leur nombre est rapidement surclassé par les cellules IgA⁺ (Stokes *et al.* 1994). La *lamina propria* intestinale des porcelets

nouvellement nés renferme surtout, au niveau des cryptes, des lymphocytes T CD2⁺ double négatifs pour CD4 et CD8. La proportion de cellules CD2⁺ CD4⁺ augmente drastiquement durant les premières semaines de la vie du porcelet, alors que les cellules CD2⁺ CD8⁺ n'augmentent qu'après 5 à 7 semaines. Chez le porc adulte, le nombre de cellules CD2⁺ CD4⁺, situées surtout au milieu de la villosité, est plus important que le nombre de cellules CD2⁺ CD8⁺, situées directement sous les cellules épithéliales. Chez les porcelets axéniques, le nombre de lymphocytes T demeure très bas, et la différenciation en CD4⁺ ou CD8⁺ semble arrêtée, même après 7 semaines de vie (Stokes *et al.* 1994). En ce qui concerne les cellules CD25⁺, elles sont retrouvées un peu partout à l'intérieur de la *lamina propria* dès la naissance et leur nombre n'est que très peu influencé par l'âge ou l'environnement (Stokes *et al.* 1994).

10.6 Les cytokines porcines et leurs rôles dans la protection de l'hôte

Au cours des dernières années, de nombreuses connaissances ont été acquises au sujet des cytokines et de leurs effets immunologiques, pathologiques et physiologiques, tant chez l'humain que chez le porc. L'accès à des cytokines purifiées, de même qu'à une gamme impressionnante d'anticorps spécifiques, permet de plus en plus l'étude de leur implication dans plusieurs pathologies chez le porc. À titre d'exemples, l'IFN- γ , le TNF- α et l'IL-1 β seraient impliquées dans la réponse précoce de porcelets nouvellement nés suite à une infection à *S. enterica* sérovar Typhimurium (Splichal *et al.* 2002), l'IL-1 α , l'IL-8, le TNF- α et l'IL-12p40 seraient impliqués dans la réponse de porcelets axéniques suite à une infection expérimentale avec une souche de *E. coli* CNF1+ (cytotoxic necrotizing factor) (Fournout *et al.* 2000), l'IL-4 et l'IL-10 seraient impliquées lors d'une infestation par le parasite *Schistosoma japonicum* (Oswald *et al.* 2001), alors qu'une infection expérimentale par le virus du syndrome respiratoire et reproducteur porcin (SRRPv) favoriserait la

synthèse d'IFN- γ et de TNF- α au niveau des macrophages pulmonaires (Choi *et al.* 2002). Pié *et al.* (Pie *et al.* 2004) ont aussi démontré que le sevrage de porcs âgés de 28 jours favorise l'augmentation intestinale du taux d'ARNm associée à l'IL-1 β , l'IL-6, et au TNF- α . L'avancement des connaissances concernant les cytokines porcines a aussi permis le développement d'une puce a ADN spécifiques au système immunitaire porcin (Ledger *et al.* 2004). Cette puce contient 63 produits de gènes, dont 20 cytokines, 11 chémokines et 12 récepteurs du système immunitaire.

10.7 L'immunisation mucoale

Le tractus gastro-intestinal constitue un des plus importants organes immunologiques de l'organisme, contenant plus de lymphocytes et de plasmocytes que la rate, la moelle osseuse et les nœuds lymphatiques combinés (Stokes et Bailey 2000). Chez la plupart des mammifères, les IgA prédominent dans les sécrétions mucoales, la salive, les larmes, le lait et la bile. Ces IgA sécrétoires (sIgA) sont capable d'induire le processus de cytotoxicité médiée par les anticorps (ADCC), de même que la phagocytose via le récepteur Fc α retrouvé à la surface de plusieurs cellules (Stokes et Bailey 2000). L'activité biologique principale des IgA serait surtout non-inflammatoire, agissant directement sur la liaison des bactéries au mucus, de même que sur la disponibilité de certains facteurs de croissance et enzymes nécessaires à la croissance des bactéries pathogènes et de certains parasites. En présence d'une barrière mucoale intacte (*i.e* IgA, mucus et cellules épithéliales), la principale fonction du système immunitaire mucoal intestinal est de garder les antigènes potentiellement nuisibles dans la lumière intestinale, afin qu'ils soient éliminés dans les fèces par l'action du péristaltisme (Killian et Russell 1994). Le processus inflammatoire n'intervient que lorsque cette barrière est abîmée et les mécanismes utilisés incluent la fixation du complément par des IgG et de nombreux mécanismes humoraux et cellulaires, dépendants de l'antigène en question (Brandtzaeg et Tolo 1982).

Les tissus lymphoïdes associés à la muqueuse (mucosal-associated lymphoid tissues, MALT) chez le porc peuvent être séparés en deux grandes divisions, soit les structures lymphoïdes structurées (amygdales, PP, nœuds lymphatiques mésentériques et bronchiques, etc.) et les autres cellules spécialisées ayant d'autres fonctions (*lamina propria* intestinale, leucocytes pulmonaires intravasculaires, etc.). Parmi les différentes cellules et structures du MALT, la *lamina propria* et les cellules M des PP constituent deux candidats potentiels pour l'induction de l'immunité mucosale intestinale.

10.7.1 Les cellules M comme cible potentielle pour la vaccination

Une meilleure connaissance du rôle des cellules M dans le transport sélectif pourrait s'avérer très utile pour l'élaboration de stratégies vaccinales mucosales (Neutra *et al.* 1996). Jusqu'à présent, l'utilisation de souches vaccinales tuées s'est avérée difficile car la digestion de macromolécules non-protégées est très rapide et la communauté scientifique ne dispose que de très peu d'informations au sujet des constituants membranaires du pôle apical des cellules M pouvant agir comme récepteurs. Une alternative serait de compacter les antigènes vaccinaux dans une microparticule les protégeant contre l'action protéolytique des enzymes intestinaux. En se basant sur le fait que les cellules M peuvent endocyter des particules de l'ordre de quelques micromètres (μm), alors que les entérocytes ne le peuvent pas (Neutra *et al.* 1996; Beier et Gebert 1998). Malgré tout, cette avenue s'avère difficile car les microparticules et les liposomes sont immédiatement captés par le mucus et n'atteignent pas la muqueuse intestinale.

Ces difficultés ont été éliminées grâce à l'utilisation de pathogènes (bactéries et virus) ciblant eux-même les cellules M afin d'envahir les tissus. L'administration *per os* de souches vaccinales vivantes atténuées de *V. cholerae*, *Salmonella typhi* et du poliovirus s'est avérée une façon sécuritaire et efficace de protéger l'organisme

d'infections subséquentes (Neutra *et al.* 1996). Néanmoins, l'approfondissement des connaissances sur les cellules M et leurs récepteurs membranaires demeure essentiel à une meilleure élaboration de stratégies vaccinales ciblant le MALT.

MATÉRIEL ET MÉTHODES, ET RÉSULTATS

ARTICLE 1

Interaction of Enteropathogenic and Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* with Porcine Intestinal Mucosa: Role of Intimin and Tir in Adherence.

Francis Girard, Isabelle Batisson, Gad M. Frankel, Josée Harel, and John M.
Fairbrother (2005).

Manuscrit accepté dans Infection and Immunity

Interaction of Enteropathogenic and Shiga-Toxin Producing *Escherichia coli* with Porcine Intestinal Mucosa: Role of Intimin and Tir in Adherence.

Francis Girard¹, Isabelle Batisson¹⁻², Gad M. Frankel³, Josée Harel¹, and John M. Fairbrother^{1*}.

¹Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Département de Pathologie et Microbiologie, Faculté de Médecine Vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Canada. ² Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR 6023, Université Blaise Pascal, Clermont-II, Aubière, France. ³Center for Molecular Microbiology and Infection, Imperial College London, London, United Kingdom.

*Corresponding author: john.morris.fairbrother@umontreal.ca

Running title: Role of Intimin and Tir in Adherence to Porcine intestinal Mucosa

ABSTRACT

The ileal *in vitro* organ culture (IVOC) model using tissues originating from colostrum-deprived newborn piglets has proven to be an effective way to study the attaching and effacing (A/E) phenotype of porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) *ex vivo*. The aim of this study was to investigate the role of intimin subtype and Tir in adherence of EPEC and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC), isolated from different animal species, to porcine intestinal IVOC. Moreover, the role of intimin in Tir-independent adherence of the human EPEC strain E2348/69 was investigated using intimin and Tir deficient derivatives. Our results demonstrated that A/E *E. coli* strains (AEEC) from various animal species and humans induce the A/E phenotype in porcine ileal IVOC, and that intimin subtype influences intestinal adherence and tropism of AEEC strains. We also showed that a *tir* mutant of EPEC strain E2348/69 demonstrates close adherence to the epithelial cells of porcine ileal IVOC segments, with microvillous effacement but with no evidence of actin polymerization or pedestal formation, and that intimin seems to be involved in this phenotype. Overall, this study provides further evidence for the existence of one or more host cell-encoded intimin receptor(s) in the pig gut.

INTRODUCTION

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are an important cause of enteric diseases in both humans and animals (Nataro et Kaper 1998). EPEC are the most common bacterial cause of diarrhea in infants from developing countries, whereas STEC, especially those of serotype O157:H7, are important emerging pathogens causing foodborne infections leading to bloody diarrhea and hemolytic-uremic syndrome in developed countries. EPEC, and certain STEC, cause typical, intestinal attaching and effacing (A/E) lesions which are characterized by intimate bacterial adherence to intestinal epithelial cells, effacement of the brush border, F-actin rearrangement, and formation of a pedestal of polymerized F-actin and other cytoskeletal elements underneath the adherence site. Most A/E phenotype elements are encoded on a 35.6- (EPEC) to 43-kb (STEC of O157:H7 serotype) pathogenicity island called locus of enterocytes effacement (LEE) (McDaniel *et al.* 1995; McDaniel et Kaper 1997). The LEE contains genes encoding an outer membrane adhesin termed intimin (*eae* gene), a type-III secretion system machinery (Esc and Sep proteins), chaperones (Ces proteins), translocator (EspA, EspB and EspD) and effector (EspF, EspG, Map) proteins as well as the translocated intimin receptor (Tir). The function of several open reading frames is still not known.

At least five distinct major intimin subtypes, designated α , β , δ , γ and ϵ , have been identified to date (Adu-Bobie *et al.* 1998a; Oswald *et al.* 2000). Receptor binding activity of intimin is located in the C terminal 280 amino acids region (Int280) (Frankel *et al.* 1994), that comprises three separate domains, two immunoglobulin-like domains, and a C-type lectin-like module (Kelly *et al.* 1999). Intimin was shown to bind to Tir (Kenny *et al.* 1997b; Deibel *et al.* 1998; Hartland *et al.* 1999), and directly to uninfected host cells (Frankel *et al.* 1994; McKee et O'Brien 1996; An *et al.* 1997; Hartland *et al.* 1999; Deibel *et al.* 2001). The latter seems to be dependent on a disulphide bridge at the carboxy terminus of Int280 (Hartland *et al.* 1999), which appears to be essential for correct folding of this domain and for carbohydrate binding by other C-type lectins (Weis et Drickamer 1996). Some published data support the existence of host cell intimin receptors, such as β 1-chain

integrins recognized by the Int280 region of alpha intimin in human EPEC (Frankel *et al.* 1996), and cell surface-localized nucleolin recognized at least by alpha and beta intimins (Sinclair et O'Brien 2004) and gamma intimin in STEC of O157:H7 serotype (Sinclair et O'Brien 2002). Some recent observations (Liu *et al.* 1999; Cleary *et al.* 2004) point to the lack of a Tir-independent receptor able to support intimin-mediated bacterial adhesion. Nevertheless, Shaw *et al.* (Shaw *et al.* 2005) recently demonstrated that the mutant strain E2348/69 Δ tir, which lacks Tir but still possesses intimin α , adheres to human intestinal IVOC in a manner independent of Tir but dependent on intimin, suggesting an interaction between surface intimin and a host cell intimin receptor.

The aim of this study was to investigate the role of intimin subtype and Tir in adherence of EPEC and STEC strains isolated from different animal species to porcine intestinal IVOC, a model which more closely reflects *in vivo* conditions than *in vitro* cell culture. Moreover, the role of intimin in Tir-independent adherence of the human EPEC strain E2348/69 was investigated using intimin- and Tir-deficient derivatives.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and growth conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 1. If not otherwise mentioned, bacteria were grown overnight in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GibcoBRL, Ontario, Canada) under agitation at 37°C, then transferred into fresh DMEM medium and grown to an OD₆₀₀ of 0.7, corresponding to approximately 2.0×10^8 CFU, in the early exponential phase prior to use. Bacteria grown for 3 hours in DMEM express LEE genes and are primed ready to produce A/E lesions (Collington *et al.* 1998b). Chloramphenicol was added to the broth culture at a final concentration of 30 µg ml⁻¹ when using strains complemented with pICC55 or pCVD438 plasmids.

Primers and PCR-based amplification for detection of the LEE genes. The primers used for detection of LEE genes in this study are listed in Table 2. Intimin subtype was determined as previously described (Adu-Bobie *et al.* 1998a; Oswald *et al.* 2000). The *tir* gene was amplified as follows: 1 x 94°C for 5 minutes and 25 x (94°C for 30 seconds, 60°C for 30 seconds, 72°C for 30 seconds), followed by a final elongation step of 7 minutes at 72°C. The PCR products were further analyzed using agarose gel electrophoresis.

Production of antisera. For the production of EspA polyclonal antisera in chickens and rabbits, and of intimin polyclonal antiserum in chickens, the *espA* and *eae* (encoding intimin) genes from the porcine EPEC (PEPEC) strain ECL1001 were amplified by PCR using the primer pairs listed in Table 3. They were then cloned, expressed, and the recombinant proteins purified as previously described for anti-Paa antiserum (Batisson *et al.* 2003). Rabbits and/or laying hens, were immunized with purified His-EspA or His-intimin fusion proteins. Some laying hens were immunized with a sonicate preparation from host strain M15 (pREP4) used for the production of recombinant protein as a control. Total antibodies were extracted from egg yolks as previously described (Batisson *et al.* 2003), and the water-soluble fraction was lyophilized and stored at 4°C. Serum containing EspA-specific antibodies was

recovered from rabbits by exsanguination and frozen at -20°C. The universal rabbit polyclonal anti-Tir_{EPEC} was obtained as previously described (Elliott *et al.* 1999b).

Collection and culture of porcine intestinal IVOC segments. Piglets were cared for in accordance with the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care. The porcine intestinal IVOC model was derived from the explant culture technique previously described by Zhu *et al.* (Zhu *et al.* 1995b) and Batisson *et al.* (Batisson *et al.* 2003) with some modifications. Briefly, segments of the duodenum, jejunum, ileum, cecum, and colon were obtained from colostrum-deprived, newborn piglets of a conventional herd. Piglets were tranquilized with mixture of 10 mg kg⁻¹ of ketamine hydrochloride (Biomeda-MTC, Ontario, Canada) and 20 mg kg⁻¹ of xylazine (Bayer, Ontario, Canada) before being euthanized with sodium pentobarbital (540 mg ml⁻¹; Pharmacie, Faculté de médecine vétérinaire, Quebec, Canada). Upon collection of the intestinal segments, the serosa was carefully removed with a forceps and mucus was gently removed with a sterile swab. Tissues were then cut into 9 mm² segments and placed mucosal side up onto biopsy foam pads (Curtin Matheson Scientific, Inc., Texas, USA) in multidish four-well Nunclon Delta Surface tissue culture plates (Invitrogen life technologies, Burlington, Ontario, Canada), up to three segments being placed on each pad. Complete RPMI 1640 medium containing 10% fetal bovine serum (Gibco, NY, USA), 0.25% lactalbumin hydrolysate, 0.2 µg ml⁻¹ of hydrocortisone, 0.1 µg ml⁻¹ of insulin, 75 mM β-mercaptoethanol, 1 % D-mannose, and 2 mM of L-glutamate and L-aspartate (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA) was added to each well. Segments were inoculated three times at hourly intervals with 50 µl of broth culture applied to the mucosal surface, and incubated at 37°C on a rocker in a 95%-O₂ and 5%-CO₂ atmosphere for 8 hours. To prevent bacterial overgrowth and acidic pH, hourly changes with sterile fresh complete RPMI 1640 medium were carried out during culture, starting 2 hours after initial inoculation of segments. Non-infected segments were also cultured in order to confirm that no external contamination occurred during the experimental process. In some experiments, broth cultures were incubated with lyophilized anti-intimin chicken antibodies previously reconstituted with sterile phosphate buffered saline (PBS) corresponding to

approximately 5 mg ml⁻¹ of total IgY content, at 37°C for 30 minutes prior to the first segment inoculation, as previously described (Batisson *et al.* 2003).

Histopathology. After culture, segments were rinsed thoroughly in sterile PBS, and fixed in 10% buffered formalin for microscopic examination. Formalin-fixed tissues were then placed into Nylon tissue biopsy bags (Thermo Shandon, Pittsburgh, PA, USA), processed, paraffin-embedded, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin, phloxine, and safranin (HPS) according to standard techniques. Sections were examined by light microscopy for the presence of typical A/E lesions and intimately adhering bacteria on intestinal cells. Briefly, the mucosal epithelium located between adjacent crypts (designated the inter-crypt mucosal epithelium, ICME) was examined for the presence of intimate-adherent bacteria, either in large aggregates or a single layer, and the mean percentage of ICME demonstrating intimate-adherent bacteria per section was calculated. At least 20 ICME per IVOC segment were examined, and each result is based on at least 10 segments from at least two different pigs.

Detection of Tir and EspA secretion, and intimin expression by immunoblotting. To promote Tir and EspA secretion, PEPEC strain ECL1001, EPEC strain E2348/69 and its *tir*- mutant strain E2348/69Δ*tir* were grown overnight in minimal essential medium (MEM, GibcoBRL, Ontario, Canada), transferred to 100 ml of fresh MEM, and incubated at 37°C with agitation to an optical density (OD) at 600 nm of 1.0, as previously described (Jarvis et Kaper 1996; Crawford et Kaper 2002). Bacteria were pelleted by centrifugation, and phenylmethylsulfonyl fluoride (50 µg ml⁻¹; Sigma Chemical Co., St-Louis, USA), aprotinin (0.5 µg ml⁻¹; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and EDTA (0.5 µM; Sigma Chemical Co., St-Louis, USA) were added to the supernatant. Proteins were precipitated by the addition of 10 % trichloroacetic acid (TCA, Sigma Chemical Co., St-Louis, USA) overnight at 4°C. After centrifugation at 4000 x *g* for 1 hour, protein pellets were washed with cold 95% ethanol and re-centrifuged at 4000 x *g* for 1 hour. Pellets were resuspended in 1.0 ml of Laemmli buffer and boiled for 5 minutes. Samples were

further analyzed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10% acrylamide).

To promote intimin expression, overnight Trypticase soy broth (TSB) cultures were diluted 1:100 in fresh DMEM and incubated for three hours at 37°C with agitation. An equivalent of an OD₆₀₀ of 0.1 was loaded onto 8% SDS-PAGE, as previously described (Knutton *et al.* 1997).

The electrophoresed polypeptides were transferred onto a nitrocellulose membrane, and examined by immunoblot using universal rabbit polyclonal anti-Tir_{EPEC} (1:1000) (Elliott *et al.* 1999b), chicken polyclonal anti-intimin or anti-EspA antiserum (1:500), or rabbit polyclonal anti-EspA antiserum (1:500). This was followed by addition of either a goat anti-rabbit IgG or goat anti-chicken IgY conjugated to HRP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The reaction was visualized using 4-chloro-1-naphthol and H₂O₂ as substrate (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA).

Electron microscopy. Additional IVOC segments were processed for electron microscopy. Tissues were fixed for 2 hours at room temperature in 2.5% glutaraldehyde, then rinsed in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate, pH 7.3) for 1.5 hours with regular changes. Samples for transmission electron microscopy (TEM) were post-fixed for 1 hour at room temperature in 2% osmium tetroxide (OsO₄). Tissues were then rinsed in water for 1.5 hours with regular changes, and dehydrated in graded ethanol series.

For TEM, tissues were embedded in Spurr resin (Marivac, St-Laurent, Quebec, Canada). Thin sections were mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined for A/E lesions with a Philips 420 transmission electron microscope at 80kV (Philips Electronics, Eindhoven, The Netherlands).

For scanning electron microscopy (SEM), samples were critical-point dried, mounted, sputter-coated (8-10 nm) with gold, and examined at 5 kV in a Hitachi S-3000N Scanning Electron Microscope (Hitachi, Rexdale, Ontario, Canada).

Image capture. Images from HPS-stained sections were captured with a CCD CoolSNAP camera (RS Photometrics, California, USA), and all images were processed with Adobe Photoshop 5.0 and Adobe Illustrator 8.0 software (Adobe Systems Incorporated, California, USA).

Statistical analysis. Results are presented as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean. A Kruskal-Wallis test was performed with commercially available software (SAS 8.1, Cary, North Carolina, USA), and *post hoc* 2-by-2 comparisons were done to assess differences between the groups; $P < 0.05$ was taken to be significant.

RESULTS

AEEC strains from various animal species induce A/E lesions in porcine ileal IVOC model. The ability of 21 AEEC isolates of various origins, O serotypes and intimin subtypes (Table 1) to adhere and induce A/E lesions in the porcine ileal IVOC model was assessed as described for porcine AEEC by Zhu *et al.* (Zhu *et al.* 1995b). *eae*- mutants derived from the prototypic EPEC strain E2348/69 (CVD206) and STEC strain 85-170 (ICC170) were included as controls.

All of the EPEC and non-O157:H7 STEC strains, possessing *eae* α , *eae* β , *eae* δ , or *eae* ϵ genes, demonstrated a mean percentage of ICME with intimately adherent bacteria of greater than 35%, being similar to that of the PEPEC strain ECL1001 and significantly different to that of the *eae*- mutant strains CVD206 and ICC170 (Fig. 1), with the exception of one EPEC strain isolated from a rabbit. The O157:H7 STEC strains, possessing *eae* γ , demonstrated a mean percentage of ICME with intimately adherent bacteria of less than 28%, significantly different to that of the PEPEC strain ECL1001. Bacteria of the O157:H7 STEC strains were mostly found individually attached to the epithelial cells as previously described (Ismaili *et al.* 1995; DeVinney *et al.* 1999b), or in the intestinal lumen, whereas EPEC tended to pile up upon one another forming larger bacterial aggregates at the surface of the cell. O157:H7 STEC strains possessing gamma intimin also showed a significant reduction in the proportion of epithelial surface covered by adherent bacteria on each ICME with intimately adherent bacteria, when compared to other strains assessed, except for the *eae*- mutant strains CVD206 and ICC170 (data not shown). Intestinal cells beneath intimately adherent bacteria in all ileal segments observed were irregular (Fig. 2A), whereas a loose association of bacteria with the intestinal mucosa of some villi with no obvious change in associated epithelial cell morphology was observed for the *eae*- mutants ICC170 and CVD206 (Fig. 2B). Neither intimately adherent bacteria nor changes in epithelial cell morphology were observed on uninfected ileal segments (data not shown).

Further observation by TEM of tissues for which intimately adherent bacteria were observed confirmed the presence of A/E lesions (Fig. 2C) for all the AEEC isolates examined in this study, including STEC of serotype O157:H7, and the absence of A/E lesions for ICC170 and CVD206 (Fig. 2D). CVD206 was often observed more closely associated with the brush border than ICC170, although neither intimate adherence, nor evidence of effacement of the adjacent brush border was noted with CVD206 and ICC170.

Intimin subtype influences intestinal adherence and tropism of AEEC strains in porcine intestinal IVOC segments. In order to further investigate the role of intimin subtype in intestinal adherence and tissue tropism of AEEC strains, we examined the adherence to porcine duodenal, jejunal, and ileal IVOC of STEC strain 85-170 carrying intimin gamma, an *eae*- mutant (ICC170) of this strain complemented in trans with pCVD438 plasmid encoding alpha intimin from EPEC strain E2348/69 (Donnenberg et Kaper 1991), prototype EPEC strain E2348/69 carrying alpha intimin and an *eae*- mutant (CVD206) of this strain complemented in trans with pICC55 plasmid encoding a hybrid intimin containing the receptor binding domain of gamma intimin on an alpha intimin backbone, which itself is 97% identical to alpha intimin (Hartland *et al.* 2000).

Before applying the strains to the porcine intestinal IVOC segments, we tested their intimin expression. Western blot analysis of intimin expression in whole cell extracts demonstrated a band with an approximate molecular weight of 94 kDa corresponding to intimin for all the wild type and complemented mutant EPEC and STEC A/E+ strains, but not for *eae*- mutant strains CVD206 and ICC170 (Fig. 3A). Nevertheless, the intimin expression level appeared to be lower, but comparable, between complemented strains, when compared to wild type strains, as previously reported (Knutton *et al.* 1997).

Adherence of STEC strain 85-170 was restricted to the ileum whereas adherence of EPEC strain E2348/69 was observed to the same extent in the ileum, jejunum, and duodenum (Fig. 4). The absence of intimin in the *eae*- mutants of the

STEC and EPEC strains resulted in a significant decrease in bacterial adherence. In the ileal IVOC segments, *trans* complementation of STEC *eae*- mutant ICC170 with pICC55 plasmid encoding gamma intimin restored the adherence capacity of ICC170 to a level similar to that of the wild-type STEC strain 85-170. In contrast, *trans* complementation of the *eae*- mutant with pCVD438 plasmid encoding alpha intimin significantly enhanced bacterial adherence in the ileal, jejunal, and duodenal IVOC segments, to a level comparable to that of the *trans* complemented derivative CVD206 (pCVD438) derived from EPEC strain E2348/69 (Fig. 4C). Inversely, *trans* complementation of EPEC *eae*- mutant CVD206 with pICC55 plasmid encoding gamma intimin significantly reduced the bacterial adherence as compared to the wild type EPEC strain, to a level similar to that of the STEC strain 85-170 (Fig. 4C).

When cecal and colonic IVOC segments were cultured and infected, only a few, scattered and mostly individual, intimately adherent bacteria were observed, for EPEC strain E2348/69 only (data not shown).

Tissues on which intimately adherent bacteria were observed were processed for TEM, and the presence of A/E lesions was confirmed for all EPEC and STEC derivatives in all IVOC segments (data not shown), whereas no A/E lesions were observed for *eae*- mutants ICC170 and CVD206 (data not shown).

A *tir* mutant of EPEC strain E2348/69 adheres closely to the epithelial cells of porcine IVOC, with microvillous effacement but no pedestal formation. Previous studies demonstrated that, although intimin can bind to uninfected host cells *in vitro* (Frankel *et al.* 1994; An *et al.* 1997; Hartland *et al.* 1999), binding to the receptor Tir is essential for triggering the focused accumulation of host cytoskeletal proteins beneath the adherent bacteria in pedestal-like structures (Rosenshine *et al.* 1996; Kenny *et al.* 1997b). In this study, we investigated the capacity of the mutant strain E2348/69 Δ *tir*, which lacks Tir but still possesses intimin, to adhere to the epithelial surface in a Tir-independent fashion.

Before applying the strains to the porcine intestinal IVOC, we tested their protein expression profiles. Western blot analysis of secreted proteins in culture

supernatants demonstrated a single 78 kDa band corresponding to Tir protein for E2348/69, but not for the mutant strain E2348/69 Δ tir (Fig. 4B), whereas a 24 kDa protein corresponding to EspA protein was detected at a similar intensity in the supernatants of ECL1001, E2348/69 and E2348/69 Δ tir (Fig. 4B). Finally, western blot analysis of whole-cell extracts of all of these strains showed a band of similar intensity with an approximate molecular weight of 94 kDa corresponding to intimin (Fig. 4A).

Compared to the wild type strain E2348/69, the mutant strain E2348/69 Δ tir demonstrated significantly less ($P<0.0001$) bacterial adherence to epithelial cells in all small intestinal segments assessed, most notably in the duodenum (data not shown). Nevertheless, the bacterial adherence of E2348/69 Δ tir was greater than that of the *eae*- mutant CVD206, although the difference was not significant by statistical analysis (data not shown). Foci of large aggregates of adherent bacteria were observed for both the wild-type EPEC strain E2348/69 (Fig. 5) and E2348/69 Δ tir (Fig. 6), in all HPS-stained sections examined, although adjacent epithelial cells appeared to be more irregular in IVOC segments inoculated with E2348/69 (Fig. 5 and 6). As previously described, for the *eae*- mutant CVD206, occasional foci of bacteria in a loose association with the intestinal mucosa, with no obvious change in adjacent epithelial cell morphology, were observed in all HPS-stained sections examined (Fig. 7).

On TEM, typical A/E lesions were observed in all intestinal segments examined for the wild type strain E2348/69 (Fig. 5), whereas effacement of the brush border beneath closely, but not intimately, adherent bacteria, and absence of pedestal, was observed for E2348/69 Δ tir (Fig. 6). Only a few bacteria of the *eae*- mutant CVD206 were found associated with the intestinal epithelial cells, with neither intimate adherence, nor effacement of the adjacent brush border (Fig. 7).

SEM analysis of the mucosal surface of whole ileal IVOC segments demonstrated a highly colonized mucosa with typical A/E lesions and gross microvillous elongation for the wild type strain E2348/69 (Fig. 5). In contrast,

relatively large areas showing clearly obvious effacement and microvillous elongation were found associated with closely, but not intimately, adherent bacteria, and absence of pedestal, for strain E2348/69 Δ *tir* (Fig. 6). As previously shown by TEM, the mucosa of IVOC segments inoculated with CVD206 were only slightly colonized by bacteria loosely attached to the healthy brush border, although rare, small mucosal areas seemed to show effacement of the brush border (Fig. 7).

Anti-intimin antibodies reduce adherence of strain E2348/69 Δ *tir* in porcine IVOC. Chicken antibodies specific for intimin of PEPEC strain ECL1001 significantly reduce intimate adherence of the wild-type EPEC strain E2348/69 in the porcine ileal IVOC model, suggesting the expression of intimin during development of A/E lesions (Girard F. *et al.*, submitted). In order to investigate the involvement of intimin in the close adherence phenotype observed for the mutant strain E2348/69 Δ *tir*, we performed blocking experiments using chicken polyclonal anti-intimin antiserum, in porcine ileal segments inoculated with E2348/69 Δ *tir*.

The presence of the anti-intimin antibodies resulted in a significant reduction ($P=0.017$) in the number of closely adherent bacteria (Fig. 8) observed for E2348/69 Δ *tir* in the ileum, compared to adherence observed in the absence of antibodies or in the presence of antibodies from hens immunized with a sonicated preparation from the host strain M15 (pREP4), the latter being used as a control (Fig. 8). No significant reduction in the number of closely adherent bacteria was observed when anti-intimin antibodies were added to the *eae*- strain CVD206 (Fig. 8).

DISCUSSION

In this study we have shown that the porcine ileal IVOC model is an effective model to study pathogenesis of AEEC infections. All the wild-type strains tested were able to induce typical A/E lesions. The use of quantitative parameters, based on the mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium demonstrating intimately adherent bacteria, allowed us show differences between the AEEC isolates. Previously, the ileal IVOC model using tissues originating from colostrum-deprived newborn piglets had proved to be an effective way to study A/E of PEPEC (Zhu *et al.* 1995b). This approach was more practical than inoculation of tissues from gnotobiotic animals, which are expensive to maintain, time-consuming, and require sophisticated facilities (Tzipori *et al.* 1985; Zhu *et al.* 1994). We have now demonstrated that this model may be used for the quantitative study of the development of A/E lesions and the role of various effector molecules in a wide range of AEEC strains, in conditions as close to *in vivo* as possible, but using a minimum of animals. Importantly, our results confirmed that intimin is essential for the development of A/E lesions (Jerse *et al.* 1990), as demonstrated by the impaired ability of the two *eae*- mutants, ICC170 (STEC) and CVD206 (EPEC), to develop A/E lesions.

In addition, we confirmed that the intimin subtype influences intestinal tropism in a Tir-subtype independent pattern (Hartland *et al.* 2000; Reece *et al.* 2001; Fitzhenry *et al.* 2003a; Fitzhenry *et al.* 2003b), a feature phenomenon previously observed in gnotobiotics piglets challenged with an STEC A/E+ strain of O157:H7 serotype with or without a switch from gamma to alpha intimin (Tzipori *et al.* 1995). The use of IVOC allowed us to more quantitatively and hence more convincingly demonstrate the role of intimin subtype in intestinal tropism. Indeed, change in intimin subtype influenced the overall bacterial adherence in the presence of Tir, strengthening the argument that intimin may interact with other, possibly eukaryotic, host intimin receptors (HIR). Whereas intimin expression appeared to be lower in complemented mutant strains than in wild type strains, it is likely that its expression was consistent between these complemented mutant strains. The reduced intensity of the band corresponding to intimin in whole-cell extracts of STEC strain 85-170 could

be explained, in part, by differences in specificity of the different intimin subtypes of PEPEC, EPEC, and STEC to the antiserum (Adu-Bobie *et al.* 1998a; Oswald *et al.* 2000). Nevertheless, preliminary results using porcine ileal IVOC demonstrated that complemented mutant strains behaved statistically in a similar manner to their respective parental strains, strongly suggesting that intimin expression in complemented strains is sufficient to promote adherence and the development of A/E lesions. Moreover, it appears that this intestinal tropism is species-independent, at least between human and porcine intestinal tissues (Hicks *et al.* 1998; Fitzhenry *et al.* 2002; Fitzhenry *et al.* 2003a). The limited capacity of strains harboring gamma intimin to adhere to the epithelial cells of porcine ileal segments may explain, in part, the relatively low prevalence of STEC strains of O157:H7 serotype in pigs (Feder *et al.* 2003), as compared to in cattle. The latter are an important reservoir of these strains which are responsible for hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome in humans (Dean-Nystrom *et al.* 1997a).

The intimin switch from gamma to alpha in STEC, and inversely in EPEC, had shown that adhesion of STEC expressing gamma intimin is restricted to the porcine ileum. In contrast, the presence of alpha intimin permitted bacterial adherence in the duodenum, jejunum, and ileum. Similarly, in a human pediatric IVOC model, STEC adherence was found to be restricted to the follicle associated epithelium (FAE) doming the Peyer's patches, whereas alpha intimin-harboring strains adhered to both the small intestine and FAE (Fitzhenry *et al.* 2003a). The presence of more extensive Peyer's patches in the ileum in comparison to the jejunum and duodenum of the pig may explain our findings. Nevertheless, we did not note any particular tropism for these structures in our study.

In porcine intestinal IVOC, deletion of the *eae* gene, encoding intimin, from wild-type EPEC strain E2348/69 resulted in significant reduction of the adherence capacity of CVD206, and a loss of A/E phenotype, as previously described (Jerse *et al.* 1990). Remarkably, although a *tir* deletion resulted in a significantly reduced adherence, absence of pedestal formation and of condensation of cytoskeletal elements beneath adherent bacteria, as has been previously described *in vitro* (Kenny

et al. 1997b), bacteria were frequently observed demonstrating a close, but not intimate, adherence pattern, accompanied by effacement of the brush border adjacent to the closely adherent bacteria. We termed this phenotype “close attachment and effacement”. As this phenotype was not observed following infection with CVD206, which expresses Tir but lacks the intimin, we therefore believe that alpha intimin of the human EPEC strain E2348/69 can interact directly with HIR of the intestinal epithelial cell surface, and that the effacement of the brush border in absence of typical pedestal formation is Tir-independent, at least in the pig gut.

Shaw *et al.* (Shaw *et al.* 2005) recently demonstrated a similar phenomenon in human IVOC, using SEM. Indeed, they showed that bacteria of the mutant strain E2348/69 Δ *tir* adhere to the brush border and induce remodeling, including brush border effacement at the site of bacterial attachment. Some of the bacteria, however, appeared to have come away from the brush border surface, leaving a bacterial footprint termed “effacing bacterial footprint”. This footprint phenotype was shown to be independent of Tir but consistent with a requirement for effector protein translocation to induce effacement of the brush border, and the presence of intimin. We have confirmed these findings in porcine ileal IVOC, using both SEM and TEM, the latter allowing us to more thoroughly investigate the close relation between adherent bacteria and the adjacent intestinal epithelial cells. In our study, the presence of areas showing effacement of the brush border in absence of adhered bacteria lead us to speculate that the relatively low number of adhering bacteria observed with E2348/69 Δ *tir* could be explained by a low-affinity intimin-HIR interaction, as previously proposed (Hartland *et al.* 1999), or by a BFP-mediated bacterial dispersal (Bieber *et al.* 1998; Knutton *et al.* 1999). Indeed, it has been demonstrated that deletion of the *tir* gene in E2348/69 Δ *tir* does not affect either secreted proteins, or intimin expression (Kenny *et al.* 1997b). As rare, small mucosal areas seemed to show effacement of the brush border on intestinal segments inoculated with CVD206 in our study, it is unlikely that intimin alone mediates such remodeling.

The decrease of bacterial adherence of E2348/69 Δ *tir* in the presence of anti-intimin antiserum strengthens the argument for a role of intimin in Tir-independent

adherence of EPEC to the host cell. Recently, Cleary *et al.* (Cleary *et al.* 2004) showed that a double mutant of E2348/69 (UMD883, *bfp*⁻, *espA*⁻, *eae*⁺) did not adhere to Caco2 and HEp-2 cells *in vitro*. These authors interpreted this inability to adhere to be due to the absence of a receptor able to support intimin-mediated bacterial adhesion in the absence of Tir *in vitro*. Considering that BFP and EspA contribute to initial adherence, we believe that these factors may be required to bring EPEC bacteria close enough to the brush border to permit intimin to bind to the HIR in the IVOC model. In this study, the argument for the involvement of intimin in Tir-independent adherence of EPEC to the host cell is also strengthened by the observation of the expression of intimin at the surface of bacteria of strain E2349/69 Δ *tir* adhered to epithelial cells as demonstrated by immunolabeling in porcine IVOC (data not shown).

In conclusion, we have demonstrated that the use of porcine ileal IVOC is a suitable, quantitative way to study the A/E phenotype of AEEC isolates from various animal species, including human EPEC and STEC. We also showed that the bacterial adherence is influenced by the intimin subtype, the latter being responsible for intestinal tropism in a Tir-subtype independent fashion, as previously described *in vivo* in gnotobiotic piglets (Tzipori *et al.* 1995). We also provided evidence for the interaction of the alpha intimin from EPEC strain E2348/69 with a eukaryotic HIR other than Tir, and propose that this HIR may be common to the human and pig gut. In light of the growing evidence for the existence of other eukaryotic HIR (Frankel *et al.* 1996; Liu *et al.* 1999; Deibel *et al.* 2001; Sinclair et O'Brien 2002; Sinclair et O'Brien 2004; Shaw *et al.* 2005), investigation of the eukaryotic receptor candidates for alpha intimin from EPEC, as well as the role of such interactions in the pathogenesis of AEEC infections, will be the challenge of future studies.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors want to thank Dr Eric Oswald for kindly providing strain E22, Dr Sylvie Pérès, Dr Chengru Zhu, and Dr Pierre Hélie for helpful scientific discussions, Guy Beauchamp for statistical analysis, and Diane Montpetit for electron microscopy.

This work was supported by grants to JMF and JH from the Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, grant 0214, the Natural Sciences Engineering Research Council of Canada, strategic grant 215841-98 and discovery grant 2294 (JMF), and by EU-Community Quality of Life project AEEC infections QLK2-2000-00600. This work was presented, in part, at the 102nd General Meeting of the American Society for Microbiology, Salt-Lake City, Utah, USA, May 2002.

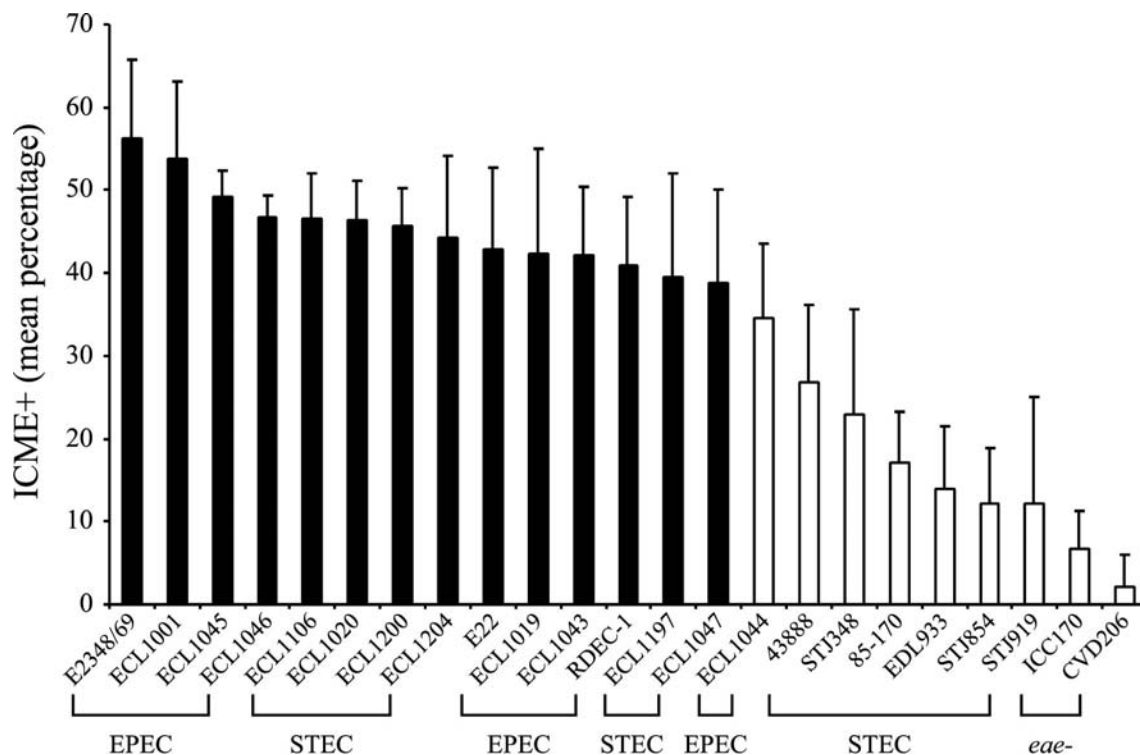


Figure 1. Adherence of various AEEC strains to the epithelial surface of porcine ileal segments. Whereas most of the strains demonstrated a mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with bacterial adherence per examined IVOC segment similar to that of PEPEC strain ECL1001, STEC strains of O157:H7 serotype possessing gamma intimin showed a significantly decreased adherence level compared to the latter PEPEC strain. White bars represent strains showing adherence significantly different ($P < 0.0001$) to that of PEPEC strain ECL1001, and not significantly different to that of both *eae-* mutants ICC170 (STEC) and CVD206 (EPEC). Results are presented as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean, and $P < 0.05$ was taken to be significant.

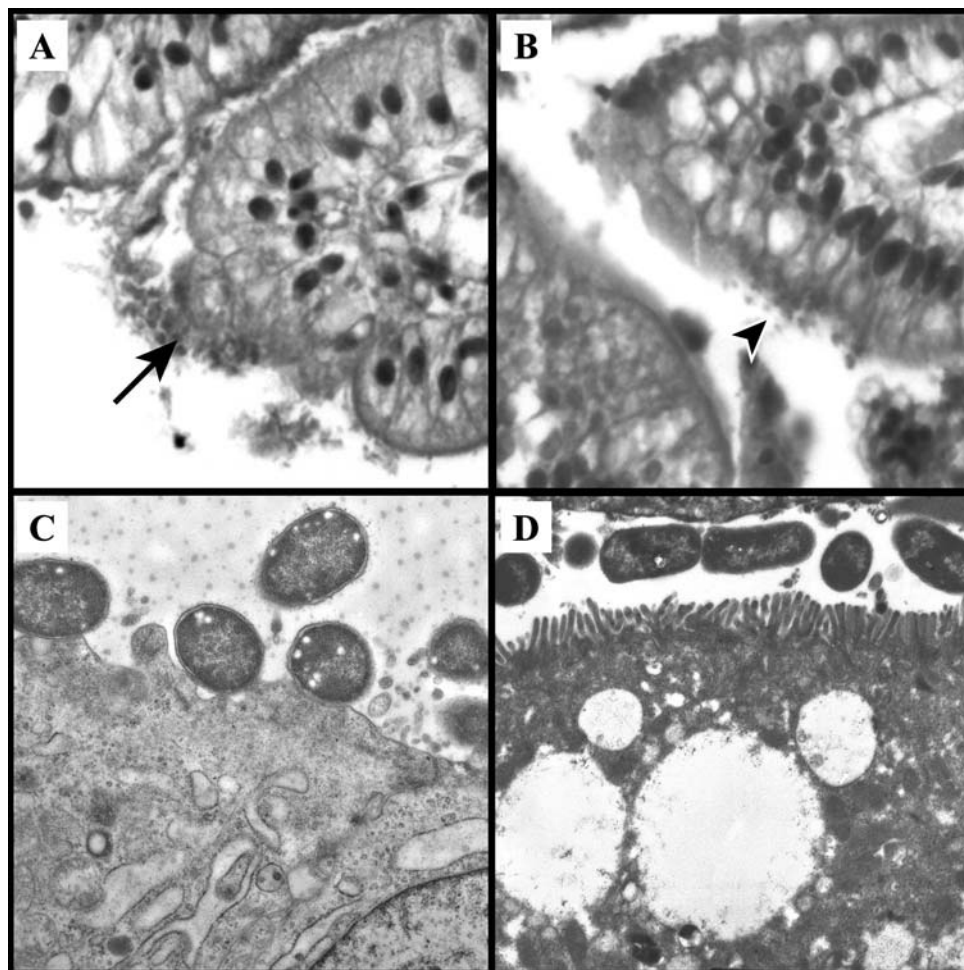


Figure 2. Micrographs of HPS-stained sections of porcine ileal segment inoculated with the PEPEC strain ECL1001 (A, Magnification, x40), or with the *eae*- mutant ICC170 (B, Magnification, x40). Typical intimately adherent bacteria and mucosal irregularities (arrow) were observed for ECL1001, whereas only a loose bacterial association with no obvious change in associated epithelial cells was observed for ICC170 (arrowhead). TEM micrographs show attachment of bacteria with effacement of brush border beneath the bacterial adherence site (Magnification, x10500) after inoculation of a porcine ileal segment with PEPEC strain ECL1001 (C), and intact brush borders at the surface of epithelial cells of a porcine ileal segment inoculated with the *eae*- mutant ICC170 (D) (Magnification, x7000).

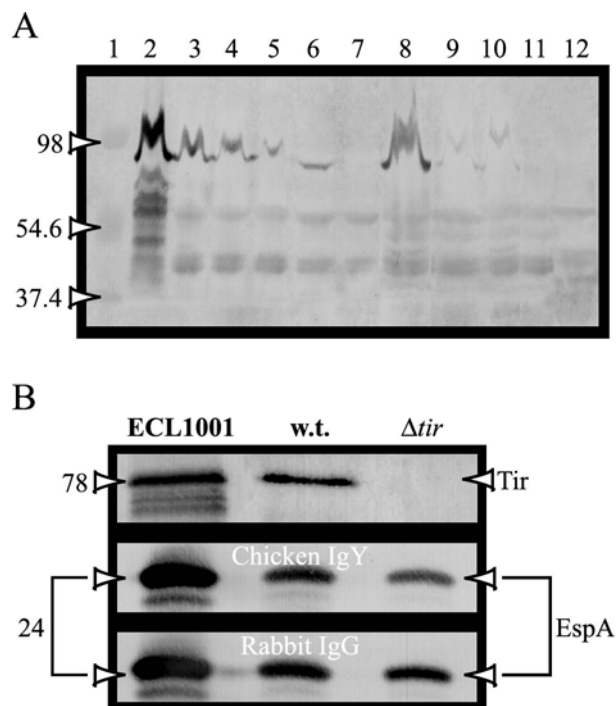


Figure 3. Western blot analysis of whole-cell extracts (A) and secreted proteins from culture supernatants (B) probed with the anti-intimin, anti-EspA or anti-Tir antisera. Chicken anti-intimin polyclonal antiserum reacted with a 94 to 97 kDa band corresponding to intimin in whole-cell extract of PEPEC strain ECL1001 (lane 2), as well as in whole-cell extracts of the wild type strains E2348/69 (lane 3) and 85-170 (lane 8), and of mutant E2348/69 Δtir (lane 4) and of all their respective complemented mutant strains, except for *eae*- mutants CVD206 (lane 7) and ICC170 (lane 11), and *E. coli* K-12 (MG1655, lane 12). Intimin expression appeared to be less high for EPEC complemented mutant strains CVD206 (pCVD438) (lane 5) and CVD206 (pICC55) (lane 6), as well as for STEC A/E+ complemented strains ICC170 (pCVD438) (lane 9) and ICC170 (pICC55) (lane 10), respectively. Lane 1 represents molecular weight markers, in kDa. Rabbit and chicken polyclonal antisera (1:500) raised against the EspA protein of the PEPEC strain ECL1001 reacted with a 24 kDa protein in the supernatant of ECL1001, the wild-type EPEC strain E2348/69 (w.t.) and E2348/69 Δtir (Δtir). On the other hand, universal rabbit polyclonal anti-Tir_{EPEC} (1:1000) detected a single 78 kDa band only in the culture supernatant of ECL1001 and E2348/69.

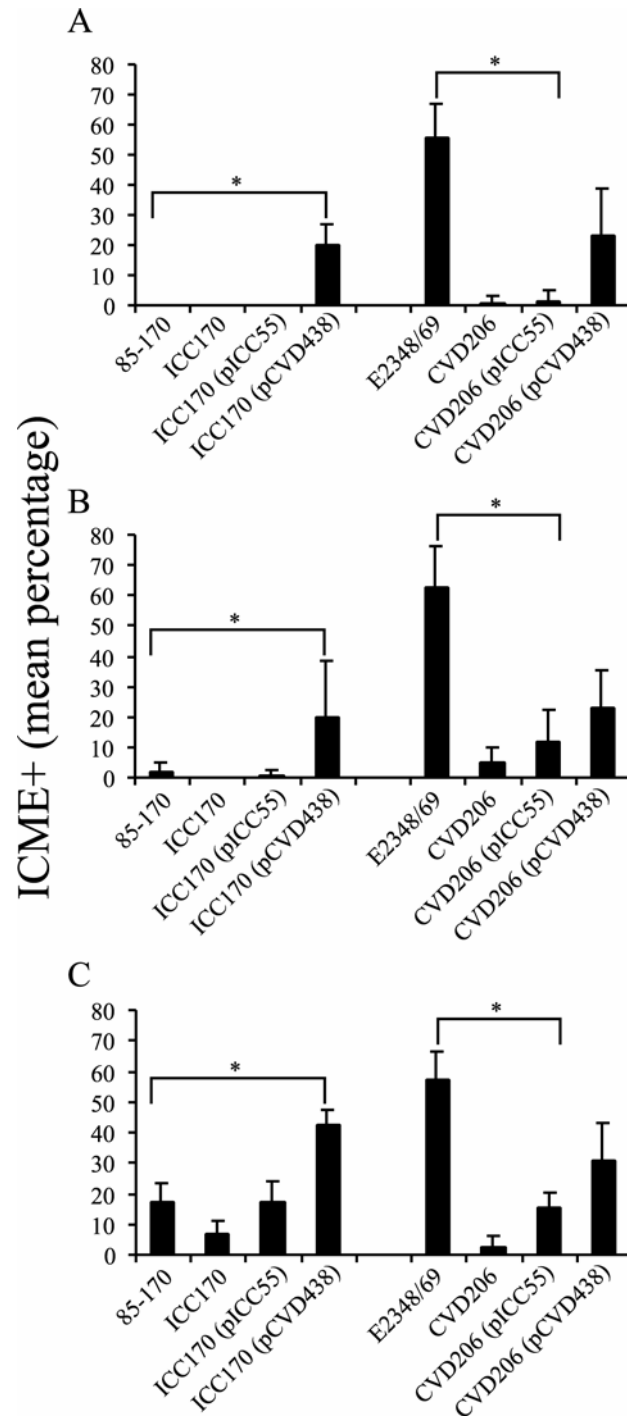


Figure 4. Intimin subtype influences the bacterial adherence and intestinal tropism of STEC and EPEC in porcine intestinal IVOC segments. Whereas adherence of STEC strain 85-170 is restricted to the ileum, EPEC strain E2348/69 extensively adhered to the duodenum (A), jejunum (B), and ileum (C). Complementation of the *eae*- mutant

ICC170 with pCVD438 plasmid encoding alpha intimin significantly enhanced ($P<0.0001$ in duodenum and ileum, $P=0.0025$ in the jejunum) the adherence level in all intestinal segments assessed. Inversely, *trans* complementation of EPEC *eae*-mutant CVD206 with pICC55 plasmid significantly reduced ($P<0.0001$) bacterial intimate adherence to a level similar to that of the STEC strain 85-170. Results are presented as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean, and $P<0.05$ was taken to be significant (*).

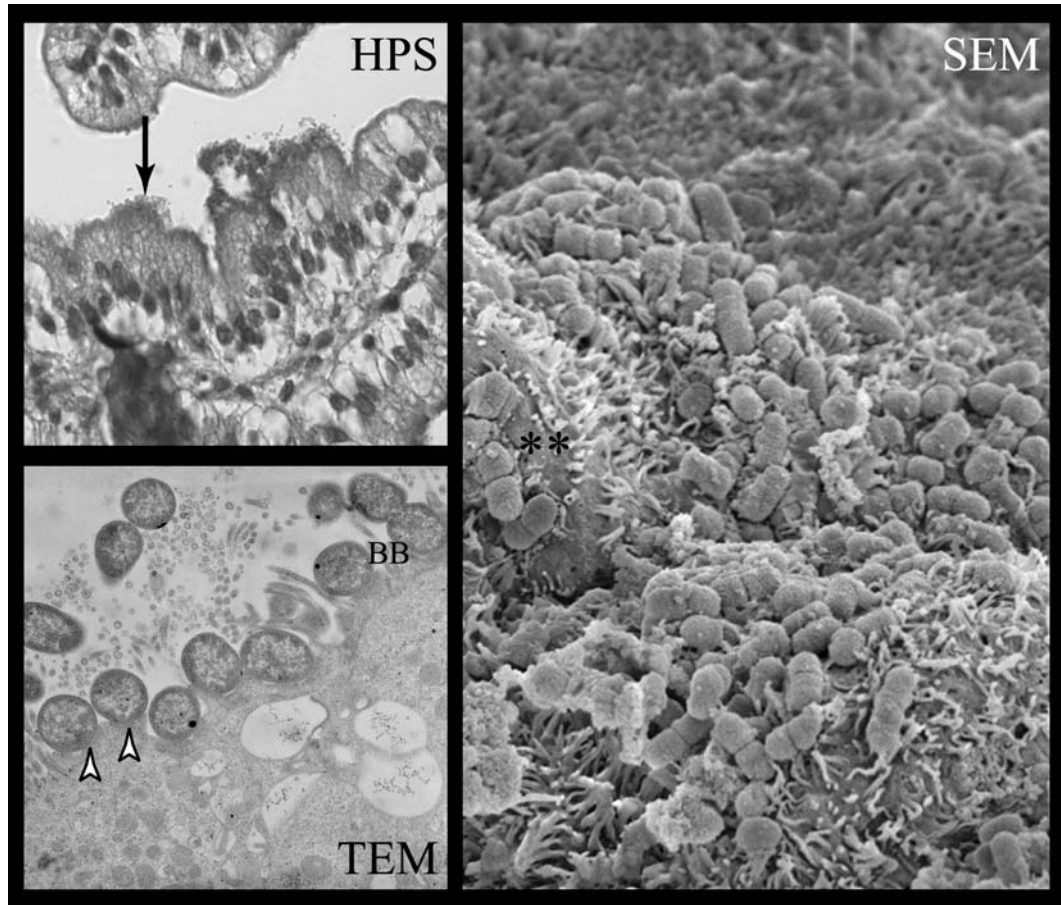


Figure 5. Wild-type human EPEC strain E2348/69 adheres to small intestinal epithelial cells and induces typical A/E lesions in porcine ileal IVOC segments. HPS-stained sections showed extensive foci of intimately adhered bacteria (HPS, arrow), as well as typical effacement of the brush border (**) and A/E lesions on TEM (arrowheads) and SEM ileal sections. BB = brush border. Magnifications: HPS, x40; TEM, x10500; SEM, x6000.

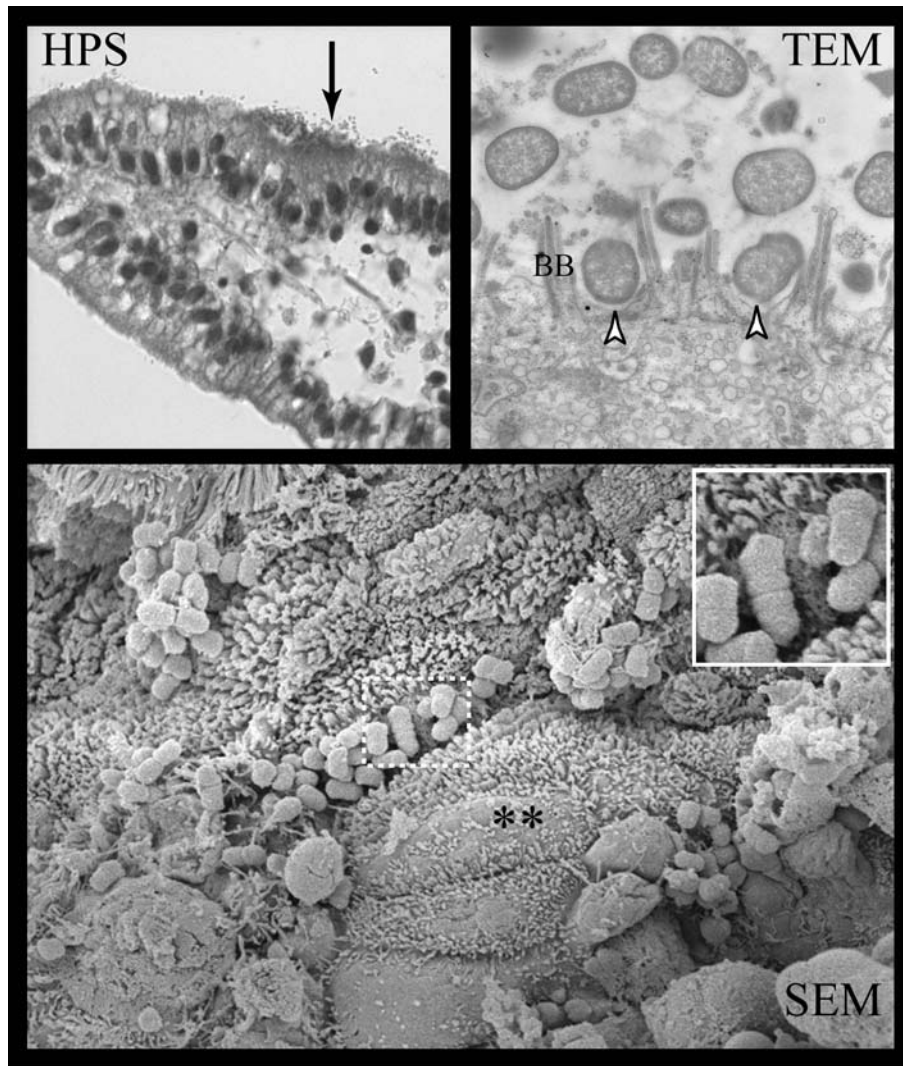


Figure 6. E2348/69 Δ *tir* mutant strain shows reduced adherence capacity to small intestinal epithelial cells on HPS-stained sections (HPS, arrow), although a loss of A/E capacity, but a close attachment with effacement of the brush border (**) with no evidence of actin polymerization and pedestal formation (arrowheads) on TEM and SEM sections. Inset demonstrates the close attachment with effacement phenotype observed with E2348/69 Δ *tir* on SEM. BB = brush border. Magnifications: HPS, x40; TEM, x10500; SEM, x6000.

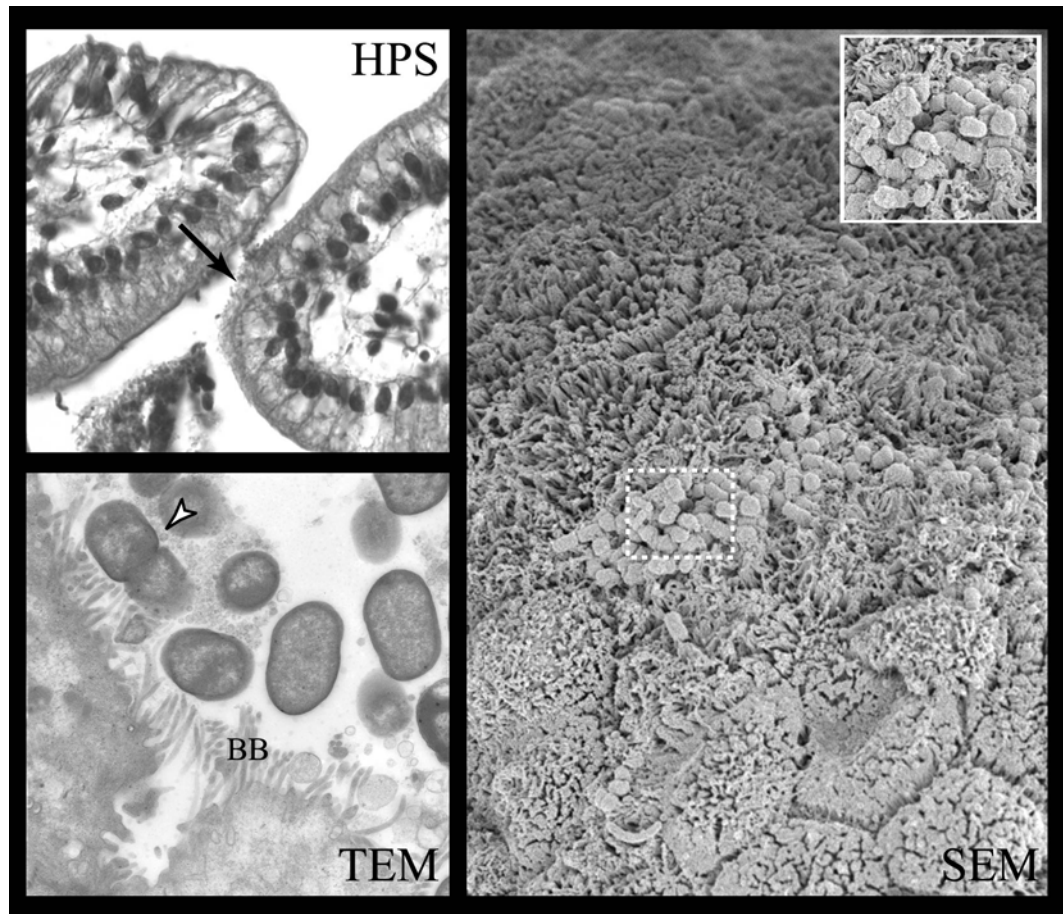


Figure 7. For the *eae*⁻ mutant strain CVD206, only a loose association of bacteria with no obvious change in associated epithelial cells was observed on HPS-stained sections (HPS, arrow), whereas bacteria closely associated to the brush border without effacement (TEM, arrowhead), or in the intestinal lumen, were observed on TEM. SEM sections show only rare, small foci of loosely associated bacteria (inset), although areas of mucosa with elongated brush border microvilli could be seen, particularly around the periphery of bacterial microcolonies. Magnifications: HPS, x40; TEM, x10500; SEM, x3000 (inset, x7000).

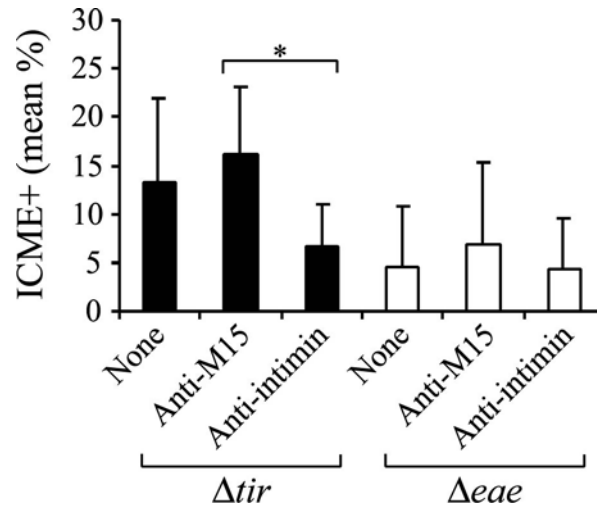


Figure 8. Reduction of the mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with bacterial adherence (ICME+) per examined porcine ileal segment inoculated with mutant E2348/69 Δtir (Δtir) or CVD206 (Δeae), following treatment with chicken anti-intimin antibodies. Treatment with anti-intimin antibodies resulted in a significantly reduced ($P=0.017^*$) mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with bacterial adherence per examined ileal segment (ICME+) inoculated with E2348/69 Δtir , whereas the latter antibodies did not affect mean percentage ICME+ per examined porcine ileal segment inoculated with CVD206. Porcine ileal segments inoculated with either bacteria of the E2348/69 Δtir or CVD206 mutants alone (None) or with E2348/69 Δtir or CVD206 mutants previously incubated with antibodies from hens immunized with a sonicate preparation from host strain (Anti-M15) were used as controls. Results are presented as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean, and $P < 0.05$ was taken to be significant.

Table I. Bacterial strains and characteristics.

Bacterial strain	Description and origin	Serotype	Intimin subtype	References
M15 (pREP4)	<i>E. coli</i> host strain for recombinant proteins	NA ^a	NA	Qiagen (Ontario, Canada)
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 strain	NA	NA	(Blattner <i>et al.</i> 1997)
ECL1001 (formerly 86-1390)	EPEC isolated from a pig	O45:H-	β	The <i>E. coli</i> Laboratory (EcL), (Hélie <i>et al.</i> 1991)
ECL1043 (formerly 89-4221)	EPEC isolated from a dog	O112ab	α	EcL, (Beaudry <i>et al.</i> 1996)
ECL1019 (formerly 86-4225)	EPEC isolated from a dog	O49:H10	δ	EcL, (Broes <i>et al.</i> 1988)
RDEC-1	EPEC isolated from a rabbit	O15:H-	β	(Cantey <i>et al.</i> 1989)
E22	EPEC isolated from a rabbit	O103:H2	β	(Marches <i>et al.</i> 2000)
ECL1044	EPEC isolated from a rabbit	Non-typable	β	EcL, this study
ECL1045	EPEC isolated from a rabbit	Non-specific typing	β	EcL, this study
ECL1046	EPEC isolated from a rabbit	O55	β	EcL, this study
E2348/69	Prototypic EPEC isolated from a human	O127:H6	α	(Levine <i>et al.</i> 1985)
CVD206	<i>eae</i> - mutant of strain E2348/69	O127:H6	-	(Donnenberg et Kaper 1991)
EDL933	STEC isolated from raw hamburger meat, implicated in a hemorrhagic colitis outbreak	O157:H7	γ	(Riley <i>et al.</i> 1983)
85-170	Derivative of STEC 84-289, isolated from a human, lacking the genes for Stx toxins	O157:H7	γ	(Tzipori <i>et al.</i> 1987)
ICC170	<i>eae</i> - mutant of strain 85-170	O157:H7	-	(Fitzhenry <i>et al.</i> 2002)
STJ348	STEC isolated from a human	O157:H7	γ	Ste-Justine's hospital for Children, Montreal, this study
STJ919	STEC isolated from a human	O157:H7	γ	Ste-Justine's hospital for Children, Montreal, this study
STJ854	STEC isolated from a human	O157:H7	γ	Ste-Justine's hospital for Children, Montreal, this study
43888	Strain lacking the genes of Stx toxins, isolated from human feces	O157:H7	γ	ATCC
ECL1047	STEC isolated from a bovine	O157:H7	γ	EcL, this study
ECL1020	STEC isolated from a bovine	O45	ε	EcL, this study
ECL1106	STEC isolated from a bovine	O26	β	EcL, this study

Table I. Bacterial strains and characteristics (*Continued*).

Bacterial strain	Description and origin	Serotype	Intimin subtype	References
ECL1197	STEC isolated from a human	O26:H11	β	EcL, this study
ECL1204	STEC isolated from a human	O45:H2	ε	EcL, this study
ECL1200	STEC isolated from a human	O103:H2	ε	EcL, this study
Intimin switches				
ICC170 (pCVD438)	Derivative of strain ICC170 harbouring α intimin	O157:H7	α	(Donnenberg et Kaper 1991; Kelly <i>et al.</i> 1999)
ICC170 (pICC55)	Derivative of strain ICC170 harbouring a hybrid of γ intimin	O157:H7	γ	(Hartland <i>et al.</i> 2000; Fitzhenry <i>et al.</i> 2003a)
CVD206 (pCVD438)	Derivative of strain CDV206 harbouring α intimin	O127:H6	α	(Jerse et Kaper 1991)
CVD206 (pICC55)	Derivative of strain CDV206 harbouring a hybrid of γ intimin	O127:H6	γ	(Phillips et Frankel 2000)
Tir mutant				
E2348/69Δ <i>tir</i>	<i>tir</i> - mutant of strain E2348/69	O127:H6	α	(Kenny <i>et al.</i> 1997b)

^aNot applicable

Table II. Primers used in this study

Genes and subtypes		Sequence of primers 5'-3'	Annealing T° (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>eaeα</i>	int.α	CCTTAGGTAAGTTAAGT	45	539	(Adu-Bobie <i>et al.</i> 1998a)
	int.Ru	TTTATTTGCAGCCCCCAT			
<i>eaeβ</i>	int.β	TAAGGATTTTGGGACCC	45	543	(Adu-Bobie <i>et al.</i> 1998a)
	int.Ru	-----			
<i>eaeγ</i>	int.γ	ACAAACTTTGGGATGTTC	55	559	(Adu-Bobie <i>et al.</i> 1998a)
	int.Ru	-----			
<i>eaeδ</i>	int.δ	TACGGATTTTGGGGCAT	45	548	(Adu-Bobie <i>et al.</i> 1998a)
	int.Ru	-----			
<i>eaeε</i>	SK1	CCCGAATTCGGCACAAGCATAAGC	55	2608	(Oswald <i>et al.</i> 2000)
	LP5	AGCTCACTCGTAGATGACGGCAAGCG			
<i>tir</i>	tir for	GGATCCATGTCTCTTTCATCGGGGGTT	60	650	This study
	tir rev	CTCGAGAACGAACGTGCGGGTCC			
<i>espA</i>	espA F	GGATCCATGGATACATCAACTGCA	55	585	This study
	espA R	CTCGAGTTTACCAAGGGATA			

Table III. His-tagged fusion proteins used in this study

Gene	Primer	Primer sequences (5'-3')	Amplicon size (bp)	Predicted molecular weight (kDa)	Reference
<i>eae</i>	F	GGATCCAATGGTGAAAAT	2712	95	This study
	R	AAGCTTTTTTACACAAACAGG			
<i>espA</i>	F	GGATCCATGGATACATCAACTGCA	585	24	This study
	R	CTCGAGTTTACCAAGGGATA			

REFERENCES

Adu-Bobie, J., G. Frankel, C. Bain, A. G. Goncalves, L. R. Trabulsi, G. Douce, S. Knutton and G. Dougan 1998a. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **36**(3): 662-8.

An, H., J. M. Fairbrother, J. D. Dubreuil and J. Harel 1997. Cloning and characterization of the *eae* gene from dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. *FEMS Microbiol Lett* **148**(2): 239-45.

Batisson, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques and J. Harel 2003. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(8): 4516-25.

Beaudry, M., C. Zhu, J. M. Fairbrother and J. Harel 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**(1): 144-8.

Bieber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez and G. K. Schoolnik 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**(5372): 2114-8.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331): 1453-74.

Broes, A., R. Drolet, M. Jacques, J. M. Fairbrother and W. M. Johnson 1988. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. Can J Vet Res **52**(2): 280-2.

Cantey, J. R., L. R. Inman and R. K. Blake 1989. Production of diarrhea in the rabbit by a mutant of *Escherichia coli* (RDEC-1) that does not express adherence (AF/R1) pili. J Infect Dis **160**(1): 136-41.

Cleary, J., L. C. Lai, R. K. Shaw, A. Straatman-Iwanowska, M. S. Donnenberg, G. Frankel and S. Knutton 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. Microbiology **150**(Pt 3): 527-38.

Collington, G. K., I. W. Booth and S. Knutton 1998b. Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection. Gut **42**(2): 200-7.

Crawford, J. A. and J. B. Kaper 2002. The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes. Mol Microbiol **46**(3): 855-68.

Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth and H. W. Moon 1997a. Pathogenesis of O157:H7 *Escherichia coli* infection in neonatal calves. Adv Exp Med Biol **412**: 47-51.

Deibel, C., S. Kramer, T. Chakraborty and F. Ebel 1998. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. Mol Microbiol **28**(3): 463-74.

Deibel, C., P. Dersch and F. Ebel 2001. Intimin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its isolated C-terminal domain exhibit different binding properties for Tir and a eukaryotic surface receptor. *Int J Med Microbiol* **290**(8): 683-91.

DeVinney, R., M. Stein, D. Reinscheid, A. Abe, S. Ruschkowski and B. B. Finlay 1999b. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect Immun* **67**(5): 2389-98.

Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**(12): 4310-7.

Elliott, S. J., S. W. Hutcheson, M. S. Dubois, J. L. Mellies, L. A. Wainwright, M. Batchelor, G. Frankel, S. Knutton and J. B. Kaper 1999b. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**(6): 1176-89.

Feder, I., F. M. Wallace, J. T. Gray, P. Fratamico, P. J. Fedorka-Cray, R. A. Pearce, J. E. Call, R. Perrine and J. B. Luchansky 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerg Infect Dis* **9**(3): 380-3.

Fitzhenry, R. J., S. Reece, L. R. Trabulsi, R. Heuschkel, S. Murch, M. Thomson, G. Frankel and A. D. Phillips 2002. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. *Infect Immun* **70**(8): 4362-8.

Fitzhenry, R. J., D. J. Pickard, E. L. Hartland, S. Reece, G. Dougan, A. D. Phillips and G. Frankel 2003a. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut* **50**(2): 180-5.

Fitzhenry, R. J., M. P. Stevens, C. Jenkins, T. S. Wallis, R. Heuschkel, S. Murch, M. Thomson, G. Frankel and A. D. Phillips 2003b. Human intestinal tissue tropism of intimin epsilon O103 *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett **218**(2): 311-6.

Frankel, G., D. C. Candy, P. Everest and G. Dougan 1994. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. Infect Immun **62**(5): 1835-42.

Frankel, G., O. Lider, R. Hershkovich, A. P. Mould, S. G. Kachalsky, D. C. Candy, L. Cahalon, M. J. Humphries and G. Dougan 1996. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. J Biol Chem **271**(34): 20359-64.

Hartland, E. L., M. Batchelor, R. M. Delahay, C. Hale, S. Matthews, G. Dougan, S. Knutton, I. Connerton and G. Frankel 1999. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. Mol Microbiol **32**(1): 151-8.

Hartland, E. L., V. Huter, L. M. Higgins, N. S. Goncalves, G. Dougan, A. D. Phillips, T. T. MacDonald and G. Frankel 2000. Expression of intimin gamma from enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Citrobacter rodentium*. Infect Immun **68**(8): 4637-46.

Hélie, P., M. Morin, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45: K"E65" strain. Infect Immun **59**(3): 814-21.

Hicks, S., G. Frankel, J. B. Kaper, G. Dougan and A. D. Phillips 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. Infect Immun **66**(4): 1570-8.

Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc and P. M. Sherman 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**(9): 3316-26.

Jarvis, K. G. and J. B. Kaper 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**(11): 4826-9.

Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall and J. B. Kaper 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**(20): 7839-43.

Jerse, A. E. and J. B. Kaper 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by EAF plasmid. *Infect Immun* **59**(12): 4302-09.

Kelly, G., S. Prasannan, S. Daniell, K. Fleming, G. Frankel, G. Dougan, I. Connerton and S. Matthews 1999. Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**(4): 313-8.

Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey and B. B. Finlay 1997b. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**(4): 511-20.

Knutton, S., J. Adu-Bobie, C. Bain, A. D. Phillips, G. Dougan and G. Frankel 1997. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun* **65**(5): 1644-52.

Knutton, S., R. K. Shaw, R. P. Anantha, M. S. Sonnenberg and A. A. Zorgani 1999. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*

undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* **33**(3): 499-509.

Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements and A. D. O'Brien 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**(3): 550-9.

Liu, H., L. Magoun and J. M. Leong 1999. β_1 -chain integrins are not essential for intimin-mediated host cell attachment and enteropathogenic *Escherichia coli*-induced actin condensation. *Infect Immun* **67**(4): 2045-9.

Marches, O., J. P. Nougayrede, S. Boullier, J. Mainil, G. Charlier, I. Raymond, P. Pohl, M. Boury, J. De Rycke, A. Milon and E. Oswald 2000. Role of Tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. *Infect Immun* **68**(4): 2171-82.

McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg and J. B. Kaper 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(5): 1664-8.

McDaniel, T. K. and J. B. Kaper 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**(2): 399-407.

McKee, M. L. and A. D. O'Brien 1996. Truncated enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 intimin (EaeA) fusion proteins promote adherence of EHEC strains to HEp-2 cells. *Infect Immun* **64**(6): 2225-33.

Nataro, J. P. and J. B. Kaper 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.

Oswald, E., H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marches and A. Caprioli 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect Immun **68**(1): 64-71.

Phillips, A. D. and G. Frankel 2000a. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. J Infect Dis **181**(4): 1496-500.

Reece, S., C. P. Simmons, R. J. Fitzhenry, S. Matthews, A. D. Phillips, G. Dougan and G. Frankel 2001. Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity. Mol Microbiol **40**(1): 86-98.

Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake and M. L. Cohen 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. N Engl J Med **308**(12): 681-5.

Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. J. Reinscheid, S. D. Mills and B. B. Finlay 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. EMBO J **15**(11): 2613-24.

Shaw, R. K., J. Cleary, M. S. Murphy, G. Frankel and S. Knutton 2005. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. Infect Immun **73**(2): 1243-51.

Sinclair, J. F. and A. D. O'Brien 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem **277**(4): 2876-85.

Sinclair, J. F. and A. D. O'Brien 2004. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. *J Biol Chem* **279**(32): 33751-8.

Tzipori, S., R. M. Robins-Browne, G. Gonis, J. Hayes, M. Withers and E. McCartney 1985. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut* **26**(6): 570-8.

Tzipori, S., H. Karch, K. I. Wachsmuth, R. M. Robins-Browne, A. D. O'Brien, H. Lior, M. L. Cohen, J. Smithers and M. M. Levine 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **55**(12): 3117-25.

Tzipori, S., F. Gunzer, M. S. Donnenberg, L. de Montigny, J. B. Kaper and A. Donohue-Rolfe 1995. The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **63**(9): 3621-7.

Weis, W. I. and K. Drickamer 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* **65**: 441-73.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Donnenberg, M. Beaudry and J. M. Fairbrother 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**(10): 4153-9.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1995b. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* **59**(2): 118-23.

Contribution des auteurs à la réalisation de l'article 1

Francis Girard: a conçu et réalisé toutes les expériences décrites dans l'article 1, à l'exception des fusions génétiques, a analysé et interprété les résultats obtenus et a rédigé le manuscrit.

Isabelle Batisson : a réalisé les fusions génétiques, a supervisé la production d'anticorps chez la poule, a participé au développement du modèle d'IVOC, et à l'écriture et à la correction du manuscrit.

Gad M. Frankel : a fournis plusieurs souches utilisées dans cet article, et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

Josée Harel : a supervisé les travaux d'Isabelle Batisson, et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

John M. Fairbrother : a supervisé les travaux de Francis Girard et d'Isabelle Batisson, et a orienté l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections.

ARTICLE 2

Host Immune Status Influences the Development of Attaching and Effacing Lesions in Weaned Pigs.

Francis Girard, Isabelle P. Oswald, Ionélia Taranu, Pierre Hélie, Greg D. Appleyard, Josée Harel, and John M. Fairbrother (2005).

Manuscrit accepté dans *Infection and Immunity*

Host Immune Status Influences the Development of Attaching and Effacing Lesions in Weaned Pigs.

Francis Girard¹, Isabelle P. Oswald², Ionélia Taranu², Pierre Hélie³, Greg D. Appleyard⁴, Josée Harel¹, and John M. Fairbrother^{1*}.

¹Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP) and ³Département de pathologie et microbiologie, Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Québec, Canada. ²Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, INRA, Toulouse, France. ⁴Western College of Veterinary Medicine, University of Saskatchewan, Saskatoon, Saskatchewan, Canada.

*Corresponding author : john.morris.fairbrother@umontreal.ca

Running Title: Pathogenicity and host response to AEEC in pigs.

Keywords: E. coli, attaching and effacing, *in vivo*, pig, cytokines

ABSTRACT

Attaching and effacing *Escherichia coli* (AEEC) have been associated with naturally-occurring attaching and effacing (A/E) lesions in weaned pigs, and although A/E lesions have been experimentally reproduced in newborn piglets, such lesions have been much more difficult to induce in older conventional pigs. Hence, the aim of this study was to examine the effect of oral administration of dexamethasone on the development of A/E lesions in weaned pigs challenged with a PEPEC strain and to investigate the involvement of local intestinal cytokine response. Dexamethasone, given orally at a dosage of 3 mg kg⁻¹, significantly enhanced both the colonization of the challenge strain and the prevalence of foci of intimately adherent bacteria, resulting in extensive A/E lesions in the ileum, cecum and colon of challenged pigs. We also confirmed the expression of both intimin and Tir by PEPEC strain ECL1001 in A/E lesions *in vivo*, which is, to our knowledge, the first report of the involvement of the latter proteins in any AEEC infections *in vivo*. Moreover, semiquantitative RT-PCR demonstrated that IL-1 β , IL-6, IL-8 and, to a lesser extent IL-12p40, are significantly upregulated in the ileum following challenge with strain ECL1001, whereas dexamethasone blocks such upregulation. Taken together, our results strongly suggested that the host immune status influences the development of A/E lesions in weaned pigs, and it appears that IL-1 β , IL-6, IL-8 and, to a lesser extent IL-12p40, are expressed during infection of weaned pigs by PEPEC and may contribute to the natural resistance of the host against PEPEC infection.

INTRODUCTION

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are an important cause of enteric disease in both humans (Nataro et Kaper 1998) and other animal species, including rabbits (Cantey et Blake 1977), calves (Janke *et al.* 1989), pigs (Hélie *et al.* 1991), and dogs (Beaudry *et al.* 1996). EPEC, and some STEC are attaching and effacing *E. coli* (AEEC), since they cause typical attaching and effacing (A/E) intestinal lesions. A/E lesions are characterized by intimate bacterial adherence to enterocytes, effacement of surface-absorptive microvilli, F-actin rearrangement, and the outgrowth of a cup-like pedestal of polymerized F-actin and other cytoskeletal elements beneath the adherence site. Most A/E phenotype elements are encoded on a 35.6 kb (EPEC) to 43 kb (STEC of O157:H7 serotype, STEC_{O157:H7}) pathogenicity island called locus of enterocytes effacement (LEE) (McDaniel *et al.* 1995; McDaniel et Kaper 1997). The LEE contains genes encoding an outer membrane adhesin termed intimin (*eae* gene), a type-III secretion system machinery (Esc and Sep proteins), chaperones (Ces proteins), translocator (EspA, EspB and EspD) and effector (EspF, EspG, Map) proteins as well as the translocated intimin receptor (Tir).

AEEC have been associated with naturally-occurring cases of A/E lesions in weaned pigs (Janke *et al.* 1989). However, although A/E lesions have been reproduced in newborn piglets using porcine EPEC (PEPEC) (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1995b), and STEC_{O157:H7} (Tzipori *et al.* 1987; Donnenberg *et al.* 1993b; Dean-Nystrom *et al.* 2000), such lesions have been much more difficult to induce in older conventional pigs. Many factors may contribute to the lack of development of A/E lesions in these pigs, including a more substantial and diversified intestinal normal flora, as well as a more mature immune system (Nabuurs 1998). Indeed, diseases associated with AEEC, such as hemolytic uremic syndrome (HUS) (Ludwig *et al.* 2002) and hemorrhagic colitis (Tanaka *et al.* 2000), are most often observed in younger or older individuals with an immature or compromised immune status. Also, it appears that the gut-associated lymphoid tissue (GALT) of the host immune system

is an important determinant of both colonization and A/E lesion development by the related murine A/E pathogen *Citrobacter rodentium* *in vivo* (Vallance *et al.* 2003).

Clinical and experimental observations have shown that the porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV), a small enveloped RNA virus from the family *Arteriviridae* that replicates primarily in macrophages (Feng *et al.* 2001), causes immunosuppression of infected pigs, resulting in increased susceptibility to several secondary bacterial diseases, such as *Streptococcus suis* (Galina *et al.* 1994) and *Salmonella choleraesuis* infections (Wills *et al.* 2000). Possible mechanisms for this immunosuppression in PRRSV-infected animals could be an inability either to produce sufficient numbers of prethymocytes or for the prethymocytes to properly target themselves to the thymus (Feng *et al.* 2001). It has been recently proposed that the ORF5 of PRRSV would induce apoptosis of thymocytes, and hence their depletion (Suarez 2000). Some preliminary experiments carried out in our laboratory have strongly suggested a relationship between the presence of naturally-occurring PRRSV infection and an increased prevalence of A/E lesions in weaned pigs challenged with PEPEC strains (Girard F. *et al.*, unpublished data).

Dexamethasone (DEX) is a long-acting synthetic glucocorticoid that exerts similar effects on the immune system to those of the ORF5 of PRRSV, primarily by suppressing innate immunity and inhibiting the production of various pro-inflammatory mediators, such as cytokines and chemokines. These effects are due to suppression of Th cell responses (Tsitoura et Rothman 2004), and to leukocyte death through apoptosis (Chen *et al.* 2004). Dexamethasone is also an anti-inflammatory agent. It has been shown to reduce leukocyte accumulation in many models (Allcock *et al.* 2001), to inhibit release of lactoferrin, a known stimulus for polymorphonuclear leukocyte (PMNs) degranulation (Schmaldienst et Horl 1996), and to reduce tracheal release of IL-8 in children with respiratory syncytial virus infection (van Woensel *et al.* 2003). Dexamethasone has been used in many animal infection models to promote bacterial colonization, including a calf model for STEC_{O157:H7} (Stoffregen *et al.* 2004), and a PRRSV-*S. choleraesuis* dual infection model (Wills *et al.* 2000).

Hence, the aim of this study was to examine the effect of oral administration of dexamethasone on the development of A/E lesions in weaned pigs challenged with a PEPEC strain and to investigate the involvement of local intestinal cytokine response in the development of these lesions.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains. The PEPEC strain ECL1001 (formerly 86-1390) (O45:H-) was isolated at the *Escherichia coli* Laboratory (EcL) of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) from a 4-week-old pig with postweaning diarrhea (Hélie *et al.* 1991). Strain ECL1001 possesses a β intimin subtype and induces mostly cecal and colonic A/E lesions in both gnotobiotic (Hélie *et al.* 1991) and conventional neonatal piglets (Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b). The strain ECL1001 Nal^r is a variant of strain ECL1001 that was obtained by its serial passage following growth in Luria Bertani (LB) broth containing concentrations of nalidixic acid from 0 to 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ at 37°C for 24 h. Strain ECL1001 Nal^r possesses all tested LEE-associated genes.

Experimental challenge of pigs. A total of forty-five weaned pigs from a conventional, certified PRRSV-negative herd were used in four separate experiments. Pigs were randomly assigned to the appropriate groups in each experiment. Pigs were weaned at 17 days of age (Day 0, D0) onto a solid granular diet containing 19% soybean protein and no antibiotics, a diet associated with high diarrhea scores in weaned pigs challenged with ETEC strains (Fairbrother *et al.*, unpublished data). Pigs were fed *ad libitum* with this diet and water for 5 days prior to bacterial infection (D0 to D5). Pigs received one of the following treatments: dexamethasone (Pharmascience Inc., Montreal, Canada) administered orally at a daily dose of 3 mg kg^{-1} (DEX⁺ groups 1, n=20, and 3, n=5) starting three days before the first bacterial challenge (D3) and continuing until necropsy (D10); or no treatment with dexamethasone (DEX⁻ groups 2, n=15, and 4, n=5). On D6, D7, D8, and D9, pigs received 10 ml of 1.2% CaCO₃ through an intraoesophageal tube, to neutralize gastric acid. Then, pigs in groups 1 and 2 were challenged with 1 ml of 1.0×10^{10} CFU of the PEPEC strain ECL1001 in 9 ml of Trypticase Soy Broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA) (PEPEC⁺) daily from D6 to D9, whereas pigs in groups 3 and 4 received 10 ml of sterile TSB broth daily (PEPEC⁻). None of the piglets demonstrated Nal^r *E. coli* colonies on fecal cultures prior to bacterial challenge. Pigs were monitored daily and general appearance, attitude, dehydration, food and water

intakes, as well as diarrhea, were evaluated in accordance with the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care.

Necropsy procedure. On D10, pigs were sedated by intramuscular injection of a mixture of 10 mg kg⁻¹ of ketamine hydrochloride (Biomeda-MTC, Ontario, Canada) and 20 mg kg⁻¹ of xylazine (Bayer, Ontario, Canada) before being euthanized by an intracardiac injection of sodium pentobarbital (540 mg ml⁻¹; Pharmacie, Faculté de médecine vétérinaire, Quebec, Canada). Necropsies were performed and a portion of the last 5 centimeters of the distal ileum, as well as of the antral part of the cecum and mid spiral colon were collected and immediately fixed in 10% neutral-buffered formalin and 2.5% glutaraldehyde for examination by light microscopy and scanning or transmission electronic microscopy, respectively. Additional portions of each tissue were placed on ice for bacteriological examination, and an additional portion of ileum (containing or lacking Peyer's patches, corresponding to the anti-mesenteric and mesenteric surface of the intestine, respectively) was flash-frozen in liquid nitrogen in 1 ml of Trizol (Gibco-BRL, Burlington, Ontario, Canada) for RNA extraction and analysis of cytokine gene expression. Peripheral blood was obtained from each pig by heart puncture in a tube without anticoagulant following sedation and immediately prior to euthanasia, for determination of serum cortisol. Blood samples were allowed to stand at 4°C overnight, before being centrifuged at 400 x *g* for 10 minutes (Splichal *et al.* 2002). All serum samples were immediately collected and frozen at -70°C until used.

Bacteriological counts. Tissues were evaluated quantitatively for the presence of Nalr *E. coli*. Samples were weighed, suspended in 1 ml of phosphate-buffered saline (PBS), homogenized at 5000 rpm by using a CAT X-120 homogenizer (PolyScience, Niles, USA) and ten-fold serially diluted in sterile PBS. Appropriate dilutions were inoculated onto MacConkey agar medium containing 50 µg ml⁻¹ nalidixic acid, using a Spiral Plater apparatus (Spiral Systems Inc, Cincinnati, USA). Lactose-positive colonies were counted and the concentration of Nalr CFU per gram of tissue calculated.

Determination of blood cortisol levels. Blood cortisol levels were measured using a solid-phase, competitive chemiluminescent enzyme immunoassay Immulite®-Cortisol automated test (Diagnostic Products Corporation, CA, USA), as previously described (Roberts et Roberts 2004). Results (nmol/L) are presented as the median for each group of pigs.

Production of antisera. Antiserum against formalinized whole bacteria of PEPEC strain ECL1001 (O45:H-) was raised in rabbits using standard techniques (Edwards et Ewing 1972). For the production of anti-intimin (rabbit and chicken) and anti-Tir (chicken) antisera, the *eae* (encoding intimin) and *tir* genes from strain ECL1001 were amplified by PCR using primer pairs listed in Table 1, as described elsewhere (Batisson *et al.* 2003). Purified His-intimin and His-Tir fusion proteins were used to immunize either rabbits (His-intimin) or laying hens (His-intimin and His-Tir). Intimin- and Tir-specific IgY was then extracted from egg yolks as previously described (Batisson *et al.* 2003), and the water-soluble fraction was lyophilized. Serum containing intimin-specific antibodies was recovered from rabbits following exsanguination, and frozen at -20°C.

Detection of Tir secretion, and intimin expression by immunoblotting. To promote Tir secretion, PEPEC strain ECL1001 was grown overnight in minimal essential medium (MEM, GibcoBRL, Ontario, Canada), transferred to 100 ml of fresh MEM, and incubated at 37°C with agitation to an optical density (OD) of 1.0 at 600 nm, as previously described (Jarvis et Kaper 1996; Crawford et Kaper 2002). Bacteria were pelleted by centrifugation, and phenylmethylsulfonyl fluoride (50 µg ml⁻¹; Sigma Chemical Co., St-Louis, USA), aprotinin (0.5 µg ml⁻¹; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and EDTA (0.5 µM; Fisher Scientific, New Jersey, USA) were added to the supernatant. Proteins were precipitated by the addition of 10 % trichloroacetic acid (TCA, Fisher Scientific, New Jersey, USA) overnight at 4°C. After centrifugation at 4000 x *g* for 1 hour, protein pellets were washed with cold 95% ethanol and centrifuged again at 4000 x *g* for 1 hour. Pellets were resuspended into 1.0 ml of 1X Laemmli buffer and boiled for 5 minutes. Samples were further

analysed by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (10% acrylamide).

To promote intimin expression in PEPEC strain ECL1001, stationary TSB cultures were diluted 1:100 in fresh Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GibcoBRL, Ontario, Canada) and incubated for an additional three hours at 37°C with agitation. An equivalent of an OD₆₀₀ of 0.1 was loaded onto 8% SDS-PAGE, as previously described (Knutton *et al.* 1997).

In both cases, electrophoresed polypeptides were transferred onto a pure nitrocellulose membrane, and immunoblotted using rabbit polyclonal anti-intimin (1:500), chicken polyclonal anti-intimin (1:500) or anti-Tir antiserum (1:500), followed by goat anti-rabbit-HRP conjugate or rabbit anti-chicken IgY-HRP conjugate (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), respectively. The reaction was visualized using 4-chloro-1-naphthol (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA).

Slide agglutination. Three colonies from MacConkey agar plates of each intestinal segment from each pig were randomly tested by slide agglutination using rabbit anti-O45 K'E65", to confirm the presence of the challenge strain ECL1001.

Histopathology. Formalin-fixed tissue samples were embedded in paraffin, sectioned at 5 µm, and stained with hematoxylin, phloxine, and safranin (HPS) according to standard techniques. Two sections from each tissue sample were examined by light microscopy, and the mucosal epithelium located between adjacent crypts (designated the inter-crypt mucosal epithelium, ICME) was examined for the presence of intimately adherent bacteria. The mean percentage of ICME demonstrating intimately adherent bacteria per section was calculated. At least 40 ICME per section were examined.

Indirect Immunofluorescence Assay (IFA). An indirect immunofluorescence assay was used for detection of O45-positive bacteria, corresponding to the O serogroup of the challenge strain ECL1001, and for detection of expression of intimin and Tir proteins in intestinal sections of challenged pigs.

Formalin-fixed intestinal sections were deparaffinized, washed in PBS, permeabilized with 0.1% saponin (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA), and treated with a blocking solution containing 10% normal donkey serum (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA) in PBS containing 1% bovine serum albumin and 1% of Tween 20 (PBS/BSA/Tween20). After several washes in PBS/Tween20, sections were incubated with an appropriate dilution in PBS/BSA/Tween20 of rabbit (O45, intimin), or chicken (Tir) primary antibodies, followed by an additional incubation step with donkey anti-rabbit Rhodamine RedX-conjugated, or donkey anti-chicken fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated secondary antibody, respectively (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., USA). DNA of epithelial cells and bacteria were counter-stained with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of 4',6-Diamidino-2-phenylindole, dilactate (DAPI) (Sigma-Aldrich CO., St-Louis, MO, USA). Sections were mounted and examined with a Leica DMR® microscope (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with epifluorescence and UV excitation modules (Chroma Technology Corp., Rockingham, VT, USA).

Transmission electron microscopy. Portions of ileum, cecum, and colon were fixed for 2 hours at room temperature in 2.5% glutaraldehyde, then rinsed in cacodylate buffer (0.1 M cacodylate, pH 7.3) for 1.5 hours with regular changes. Portions of tissues for which typical intimately adherent bacteria were observed on light microscopy (2-3 pigs per group) were post-fixed for 1 hour at room temperature in 2% osmium tetroxide (OsO_4), rinsed in water for 1.5 hours with regular changes, and dehydrated in graded ethanol series. Tissues were then embedded in Spurr resin (Marivac, St-Laurent, Quebec, Canada). Thin sections were mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined for A/E lesions with a Philips 420 transmission electron microscope at 80kV (Philips Electronics, Eindhoven, The Netherlands).

RT-PCR detection of cytokine mRNA and densitometric quantification of PCR products. All ileum samples from two randomly selected experiments, conserved in Trizol at -80°C , were homogenized using a CAT X-120 homogenizer (PolyScience, Niles, USA). Total RNA was extracted as recommended by the

manufacturer. The RNA was resuspended in 50 to 500 μ l of ultrapure water containing 0.02% (wt/vol) diethyl pyrocarbonate (Sigma, St. Quentin Fallavier, France) and 1 mM EDTA. Total RNA was quantified by using a spectrophotometer at an optical density of 260 nm (OD_{260}), and the purity was assessed by determining the OD_{260}/OD_{280} ratio. All of the samples had an OD_{260}/OD_{280} ratio above 1.8. An RT-PCR procedure was performed as previously described (Dozois *et al.* 1997). Briefly, 1 mg of RNA was reverse transcribed (Superscript II RNase H 2 ; Life Technologies, Eragny, France) and then amplified (*Taq* DNA polymerase; Promega, Charbonnières, France). Oligonucleotide primers for interleukins (IL) IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, tumor-necrosis factor α (TNF- α), inducible nitric oxide synthase (iNOS), and cyclophilin, and the number of PCR cycles selected for each PCR amplification of porcine cytokines and cyclophilin cDNAs were described elsewhere (Dozois *et al.* 1997; Pampusch *et al.* 1998; Fournout *et al.* 2000; Oswald *et al.* 2001). Amplified DNA was analyzed by electrophoresis and quantified densitometrically using the Quantity One program (Bio-Rad, Hercules, USA). To compare the relative cytokine mRNA expression levels among samples, the values were presented as the ratio of the band intensity of the cytokine-specific RT-PCR product over that of the corresponding constitutively expressed “house-keeping” gene, cyclophilin.

Image capture. Images of tissue sections from histopathological and IFA examination were captured with a CCD CoolSNAP camera (RS Photometrics, California, USA), and were computer-processed using Adobe Photoshop 5.0 and Adobe Illustrator 8.0 software (Adobe Systems Incorporated, California, USA).

Statistical analysis. Results are presented as scatter plots with the median. A Wilcoxon Two-Samples test (cortisol, cytokines), a Mixed linear model with repeated measures (colonization), or a Logistic regression model with repeated measures (prevalence) were performed with commercially available software (SAS 8.1, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA), and Kruskal-Wallis or Tukey *post-hoc* comparisons were done to assess differences between the groups, respectively. A $P < 0.05$ was taken to be significant.

RESULTS

Confirmation by immunoblotting of the ability of the anti-intimin and anti-Tir sera to detect their homologous proteins. A 97 kDa band, corresponding to intimin, was recognized in the whole cell extract of the PEPEC strain ECL1001, on immunoblotting. A 80 kDa band, corresponding to the secreted protein Tir, as well as some breakdown products were revealed in the culture supernatant of the PEPEC strain ECL1001, on immunoblotting (Fig. 1).

Treatment with dexamethasone results in more extensive A/E lesions in weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001. In order to evaluate the role of the host immune status on the development of A/E lesions, the immunosuppressant agent dexamethasone was administered orally to weaned pigs which were then experimentally challenged with PEPEC strain ECL1001. The level of colonization by O45-positive Nal^r *E. coli* was significantly greater ($P=0.008$) in DEX⁺/PEPEC⁺ pigs, than in DEX⁻/PEPEC⁺ pigs (Fig. 2A). No O45+ bacteria were recovered from the DEX/PEPEC⁻ pigs (data not shown). A significantly higher proportion of DEX⁺/PEPEC⁺ pigs than DEX⁻/PEPEC⁺ pigs ($P=0.003$) demonstrated foci of intimately adherent bacteria when all the examined intestinal tissues were considered, this difference being most marked in the colon when tissues were considered individually ($P=0.011$) (Table 2). Moreover, among the A/E-positive pigs, DEX⁺/PEPEC⁺ pigs demonstrated a substantially higher, but not significant ($P=0.37$ in the ileum and caecum, $P=0.09$ in the colon) proportion of ICME with intimately adherent bacteria, than DEX⁻/PEPEC⁺ pigs (Fig. 2B). In DEX⁺/PEPEC⁺ pigs, extensive foci of intimately adherent bacteria were observed, and enterocytes beneath intimately adherent bacteria were irregular, condensed, and hypereosinophilic, and some were desquamated in the intestinal lumen (Fig. 3A). Inflammation was mild to minimal, and limited to colonized areas, being characterized by the presence of polymorphonuclear leukocytes (PMNs) in the sub-basal lamina propria, and by increased numbers of PMNs in the villous capillaries and venules. No villous atrophy and no histopathologic evidence of confounding infections were observed. In contrast, in DEX⁻/PEPEC⁺ pigs, only a few, scattered, A/E lesions, with no obvious

changes in the morphology of enterocytes beneath adherent bacteria, were observed among intestinal sections examined.

IFA staining revealed O45-positive bacteria in all examined foci of intimately adherent bacteria, corresponding to the challenge PEPEC strain ECL1001 (Fig. 3B). Tissues for which typical intimately adherent bacteria were observed on light microscopy also demonstrated typical A/E lesions with actin condensation and formation of cup-like pedestals on TEM (Fig. 4).

Macroscopic examination of the ileal segments demonstrated that Peyer's patches were highly developed in DEX⁻/PEPEC⁺ pigs, but were reduced in size in DEX⁺ pigs, whether challenged or not. The reduction in size of ileal Peyer's patches was also observed in HPS-stained ileal sections (data not shown).

Pigs that received DEX, whether challenged or not with the PEPEC strain, developed mild to moderate diarrhea, and also showed truncal obesity, two common characteristics of glucocorticoid excess (Ottonello et Primavera 1979; Nieman 2002), starting 24 to 48 hours after the initial oral intake of DEX. This condition persisted until the end of the experimental procedure. Nevertheless, neither dehydration, nor other relevant clinical signs were observed during the experimental procedure, for any of the pigs used in this study.

Treatment with dexamethasone resulted in a marked decrease in endogenous blood cortisol levels in weaned pigs. Endogenous blood cortisol levels, which are known to be greatly lowered following high-dose corticosteroid therapy (Nieman 2002), were measured and used as a marker of the presence of a high dose of dexamethasone in the serum of the weaned pigs used in this study. Median blood cortisol levels were significantly lower ($P < 0.0001$) in DEX⁺/PEPEC⁻ and DEX⁺/PEPEC⁺ pigs (< 10.2 nmol/L, the analytical sensitivity of the test used) than in DEX⁻/PEPEC⁻ (178 nmol/L) and DEX⁻/PEPEC⁺ (179 nmol/L) pigs.

Intimin and Tir are both expressed in A/E lesions *in vivo* in pigs treated with dexamethasone and challenged with PEPEC strain ECL1001. IFA was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections from infected pigs in order to investigate the expression of the intimin and its translocated receptor Tir in the foci of intimately adherent bacteria. The expression of intimin, either colocalized with Tir protein, or alone, was frequently observed in foci of intimately adherent bacteria found in the ileum, cecum and colon of DEX⁺/PEPEC⁺ pigs, using a multi-labeling IFA with anti-ECL1001 intimin and Tir polyclonal antibodies (Fig. 3C, D, E), whereas Tir protein was only rarely detected in absence of the intimin expression (data not shown). The intimin was localized at the bacterial surface, whereas Tir expression appeared distinct from the bacteria and seemed to be localized inside the epithelial cells, mostly on the apical surface at sites where bacterial intimate adherence occurred (Fig 3C, D, E).

PEPEC strain ECL1001 induces an enhanced intestinal production of IL-1 β , IL-6, IL-8, and IL-12p40 pro-inflammatory cytokines in weaned pigs. The ability of the PEPEC strain ECL1001 to induce expression, at the transcriptional level, of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40 and TNF- α , as well as iNOS, was investigated by semiquantitative RT-PCR in Peyer's patch-containing (PP-containing) or -lacking (PP-lacking) ileum segments, of weaned pigs necropsied at 96 h after initial bacterial challenge.

IL-6 and IL-8 mRNA levels were significantly higher ($P=0.03$ and $P=0.01$, respectively) in challenged DEX⁻/PEPEC⁺ pigs ($n=5$), than in unchallenged DEX⁻/PEPEC⁻ pigs ($n=5$), in PP-containing ileum segments (Fig. 5). On the other hand, IL-1 β mRNA levels were significantly higher ($P=0.023$), IL-12p40 mRNA levels were higher although not significantly, and IL-6 mRNA levels were significantly lower ($P=0.035$) in challenged DEX⁻/PEPEC⁺ pigs than in unchallenged DEX⁻/PEPEC⁻ pigs, in PP-lacking ileum segments (Fig. 5). No statistically significant differences between the DEX⁻/PEPEC⁻ and DEX⁻/PEPEC⁺ pigs were noted for the other tested cytokines, including TNF- α and iNOS (data not shown) (Fig. 5).

Dexamethasone blocks the intestinal production of pro-inflammatory cytokines in weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001. In spite of the finding that the levels of mRNA corresponding to some cytokines were modulated following challenge with the PEPEC strain ECL1001, only a few, scattered, A/E lesions were observed in DEX⁻/PEPEC⁺ pigs. Hence, the effect of dexamethasone, which induced a significant increase in the bacterial colonization and prevalence of A/E lesions in challenged DEX⁺/PEPEC⁺ pigs, on the intestinal mRNA level of pro-inflammatory cytokines and iNOS, was investigated in PP-containing or PP-lacking ileum segments of weaned pigs necropsied at 96 h after initial bacterial challenge.

Interestingly, lower levels of mRNA were observed in challenged DEX⁺/PEPEC⁺ pigs as compared to challenged DEX⁻/PEPEC⁺ pigs, for IL-1 β and IL-12p40 in PP-lacking ileal segments and IL-6 in PP-containing ileal segments. These differences were significant ($P=0.005$) for IL-12p40 (Fig. 5). No statistically significant differences were noted for the other tested cytokines (data not shown).

DISCUSSION

We have clearly demonstrated that the host immune status influences the development of attaching and effacing lesions in weaned pigs. Dexamethasone, given orally for 7 days at an immunosuppressive dose, significantly enhanced intestinal PEPEC colonization and development of extensive A/E lesions, in weaned pigs experimentally challenged with a PEPEC strain. Hence, in contrast to preliminary challenge experiments carried out in our laboratory using weaned pigs, where no immunosuppressive treatment was given, we have successfully reproduced typical intimate adherence leading to A/E lesions, which were attributable to the challenge strain as evidenced by the presence of O45+ bacteria in the foci of A/E lesions. We also showed that endogenous blood cortisol levels were significantly lower in DEX⁺ pigs than in DEX⁻ pigs, strongly suggesting the presence of a high dose exogenous glucocorticoid dexamethasone in the serum of the DEX⁺ pigs used in this study (Nieman 2002).

This challenge model permitted us to examine the involvement of intimin and its translocated intimin receptor Tir in the development of A/E lesions by the PEPEC strain ECL1001 in weaned pigs. Our finding that these proteins are frequently expressed in a co-localized pattern beneath intimately adherent bacteria strongly suggests that these two effectors are virulence factors implicated in the development of A/E lesions by PEPEC *in vivo* in weaned pigs, strengthening conclusions which have to date been based mostly on experiments carried out in *in vitro* culture conditions. Our results also corroborate the observations for the related murine A/E pathogen *C. rodentium* (Deng *et al.* 2003), where Tir protein is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice.

Effects of glucocorticoids, such as dexamethasone, include inhibition of the secretion of IL-2, GM-CSF, IL-4, IL-6 (Brunetti *et al.* 2002), IFN- γ (Hu *et al.* 2003), and TNF- α (Dziedzic *et al.* 2003), and of IL-12p40 by human monocytic cells (Ma *et al.* 2004). These effects are mediated via inhibition of various pro-inflammatory

transcription factors such as activator protein-1 (AP-1), NF-AT, NF- κ B, and STATs pathway (Adcock 2001). The importance of T and/or B-cells in the development of prolonged inflammatory and crypt hyperplasia associated with *C. rodentium*-induced A/E lesions in RAG1 knockout mice has recently been demonstrated (Vallance *et al.* 2002a). It has also been hypothesized that the underlying host defense defect resulting in these lesions may be specific to the gastrointestinal tract and possibly involves the intestinal epithelium, since enterocytes are the host cells that primarily interact with *C. rodentium* (Vallance *et al.* 2003). Enterocytes are considered as the watchdog for the natural immune system (Eckmann *et al.* 1995; Neish 2002) and there is a growing body of *in vivo* and *in vitro* evidence that supports the production of pro-inflammatory cytokines by enterocytes. For example, rat colonocytes reportedly express IL-1 β mRNA, mouse and human Paneth cells are a possible source of TNF- α , rabbit M cells reportedly secrete IL-1 α , and human (Pritts *et al.* 2002) and rat enterocytes possess histochemically detectable IL-6, as well as IL-6 receptors (Stadnyk *et al.* 1995; Rogler et Andus 1998). In addition to enterocytes, other cell types participate in the immune surveillance of the mucosal surface. These cells include intestinal dendritic cells (Stagg *et al.* 2003), intraepithelial lymphocytes and B/T cells in PP, M cells in the dome epithelium (Spahn et Kucharzik 2004), and monocytes/macrophages (Ma *et al.* 2003).

The need for a fuller understanding of the mucosal immune consequences of PEPEC infection in weaned pigs led us to investigate the pro-inflammatory response in PP-containing and PP-lacking regions of the ileum, using RT-PCR. Interestingly, a significant upregulation of mRNA levels of pro-inflammatory cytokines IL-1 β , IL-6 and IL-8 was observed in the ileum of DEX⁻/PEPEC⁺ pigs, in which few A/E lesions were observed, but not in pigs having received dexamethasone prior to experimental challenge (DEX⁺/PEPEC⁺), in which more extensive A/E lesions were observed. Moreover, comparisons between DEX⁻/PEPEC⁺ and DEX⁺/PEPEC⁺ pigs confirmed a significant inhibitory effect of dexamethasone on the expression of IL-12p40, as previously described (Ma *et al.* 2004). Dexamethasone also tended to inhibit the expression of IL-1 β and IL-6, but to upregulate IL-8. The absence of significant

differences between DEX⁻/PEPEC⁺ and DEX⁺/PEPEC⁺ pigs may be explained by the number of samples tested in our study. The finding of a low cytokine response in challenged DEX⁺/PEPEC⁺ pigs in which extensive A/E lesions were observed suggests that this response may contribute to protection of the weaned pig against development of A/E lesions. Our findings are in agreement with the study by Ramirez *et al.*, who showed a stimulation of the expression of proinflammatory cytokines secreted both by enterocytes and by PP lymphocytes which can activate effector mechanisms in the epithelium, in two-month-old rabbits orally inoculated with the rabbit EPEC strain E22 (Ramirez *et al.* 2005). Furthermore, this cytokine response profile, which included IL-6 and IL-1 β and which may be involved in the development of the diarrhea induced by EPEC, depends on the presence intimin. Although our results demonstrated that dexamethasone exerted significant inhibitory effects on the expression of proinflammatory cytokines, it remains possible that this steroid hormone-like molecule (Saklatvala 2002) could have had some effect on the expression of bacterial virulence genes, such as intimin and Tir, as has been observed for norepinephrine, which participates in the initiation of the quorum sensing mechanism (Sperandio *et al.* 2003). This mechanism has been shown *in vitro* to control the expression of type III secretion gene transcription and protein secretion in STEC_{O157:H7} and EPEC (Sperandio *et al.* 1999)I and *in vivo* to influence the colonization of the porcine intestine by STEC_{O157:H7} (Jordan *et al.* 2005). Such an effect on the expression of bacterial virulence genes could have positively influenced the colonization and the further development of A/E lesions by ECL1001 in DEX⁺/PEPEC⁺ pigs. Nevertheless, further investigations are required to address such hypothesis.

The differences observed in our study regarding the upregulation of cytokines between the PP-containing and PP-lacking regions of the ileum strongly suggest the involvement of different host immune cells or structures in PEPEC pathogenesis. Indeed, in PP, IL-6 may be synthesized and secreted by dome epithelial cells and macrophages, and directly target differentiated B cells beneath the PP. IL-6 is a multifunctional cytokine implicated in sIgA synthesis by differentiated B cells in the presence of dendritic cells (Hedges *et al.* 1995; MacDonald et Monteleone 2001) and

in initialization of a local acute phase response through the synthesis of C-reactive protein (Hedges *et al.* 1995; MacDonald et Monteleone 2001). Moreover, IL-6 is required for a protective immune response to systemic *E. coli* infection in mice (Dalrymple *et al.* 1996). For its part, IL-8 may be synthesized directly by the epithelial cells of the dome epithelium, or by macrophages and/or fibroblasts of the lamina propria, in order to initiate neutrophil recruitment (Rogler et Andus 1998). This recruitment was found to be mild to minimal on HPS-stained sections examined in this study (data not shown). On the other hand, the upregulation of IL-1 β and, to a lesser extent IL-12p40, observed in PP-lacking regions of the ileum could be the result of direct stimulation of macrophages by PEPEC, thus allowing the immune response to be oriented as Th1 or Th2.

PP and M cells appear to be involved in the A/E pathogenic process *in vitro* and *in vivo* (Inman et Cantey 1984; Phillips *et al.* 2000b). M cells are constantly transporting bacterial products, and other bioactive molecules, from the lumen into the dome region of the PP (MacDonald et Monteleone 2001). Dexamethasone is known to considerably reduce the size of ileal PP, and markedly deplete M cells and lymphocytes in the dome epithelium by necrosis and apoptosis, respectively (Roy et Walsh 1992). An impaired uptake and transport of PEPEC immune particles to PP via M cells may also have contributed to the increased susceptibility to A/E lesions in DEX⁺/PEPEC⁺ pigs, by allowing bacteria to evade immune detection at the mucosal level.

In vitro studies have shown that EPEC and STEC_{O157:H7} stimulate early upregulation of the transcription factor NF- κ B and of the production of IL-8 (Savkovic *et al.* 1997; Hecht *et al.* 1999), while prolonged infection resulted in a downregulation of NF- κ B, IL-6 and IL-8, in an EspB-dependent manner (Hauf et Chakraborty 2003). In our study, the upregulation of IL-6 and IL-8 observed in non-treated, challenged weaned pigs may be the result of an A/E lesion-independent stimulation of epithelial cells in absence of EspB translocation within the host cell cytoplasm, as previously demonstrated by Savkovic *et al.* in infected T84 intestinal cells (Savkovic *et al.* 1997). On the other hand, the significant downregulation of IL-

6 in PP-lacking, but not in PP-containing regions of the ileum, could reflect prolonged infection of enterocytes (Hauf et Chakraborty 2003), although this will need further investigation.

Additionally, Simmons *et al.* (Simmons *et al.* 2002) confirmed an important role for IL-12 and IFN- γ in limiting *C. rodentium* infection to the murine colonic epithelium, hypothesizing that the enhanced susceptibility of gene knockout IL-12- and IFN- γ -deficient mice might be due, in part, to an attenuated expression of the inducible β -defensin mBD-3. The implication of β -defensin cannot be discussed with respect to the data reported in our study. However, IL-12p40 seems to play a role in the resistance to bacterial colonization and development of A/E lesions in weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001, as it appears to be upregulated following infection, and the inhibition of its expression was associated with more extensive A/E lesions in pigs. Another study demonstrated that one of the murine host defense mechanisms encountered by *C. rodentium* during its infection of the colon is the upregulation of iNOS expression (Vallance *et al.* 2002b). Moreover, *in vitro* studies demonstrated that LPS of EPEC downregulates nitric oxide synthesis in characterized human small intestinal lamina propria fibroblasts (Chakravorty et Kumar 1999). iNOS-derived nitric oxide is a central effector molecule in the innate immune system, and its primary function in host defense appears to be to damage and destroy pathogens (Nathan et Shiloh 2000). In the present study, iNOS was not significantly modulated in any of the intestinal segments tested, but nevertheless showed a trend to be upregulated in the ileum, particularly in PP-containing regions.

Taken together, these results strongly suggest that the host immune status influences the development of A/E lesions in weaned pigs. *In vivo*, it appears that IL-1 β , IL-6, IL-8 and, to a lesser extent IL-12p40, are expressed during infection of weaned pigs by PEPEC and that these cytokines may contribute to the natural resistance of weaned pigs to PEPEC colonization and to the development of A/E lesions, at least in the ileum. Our results also strengthen the argument that the expression of both intimin and Tir is a relevant mechanism in the pathogenesis of PEPEC infections *in vivo*. To our knowledge, this is the first report of the

involvement of intimin and Tir proteins of any AEEC infections *in vivo*. As a growing body of evidence now suggests that existing *in vitro* infection models cannot be extrapolated directly to colonization and disease processes *in vivo* (Deng *et al.* 2003; Mundy *et al.* 2004), the model described in this paper will now permit further study of the pathogenesis of EPEC infections *in vivo* leading to a fuller understanding of the interactions between the immune system of the host, the bacteria, and their various effectors.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Clarisse Desautels, Éric Dionne, Luc Héroux, Brigitte Lehoux, Jade-Pascale Prévost Lemyre, Joanie Lussier, Chantal Riendeau, Andrée Seyer, and Donald Tremblay for technical assistance, Guy Beauchamp for statistical analysis, and Diane Montpetit for transmission electron microscopy.

This work was supported in part by grants to JMF and JH from the Fond Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies, grant 0214, the Natural Sciences Engineering Research Council of Canada, strategic grant 215841-98 and discovery grant 2294 (JMF), and by EU-Community Quality of Life project AEEC infections QLK2-2000-00600.

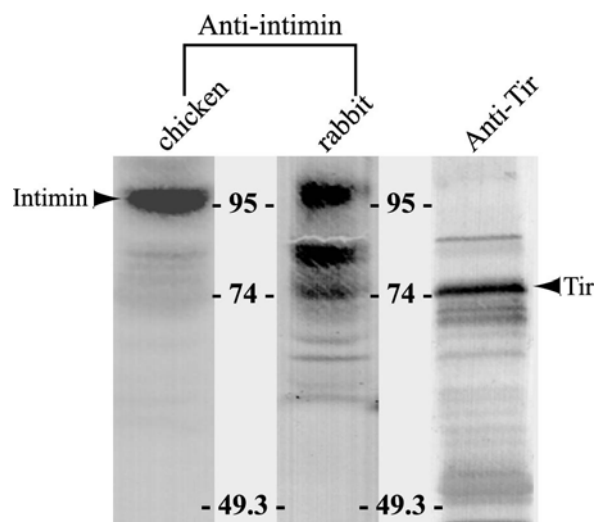


Figure 1. Western blot analysis of whole-cell extract and secreted proteins from culture supernatants of the PEPEC strain ECL1001 using either rabbit or chicken polyclonal anti-intimin antisera, and chicken polyclonal anti-Tir antiserum, respectively. The whole-cell extract reacted with both intimin antisera to reveal a 97 kDa band and some breakdown products, whereas the concentrated supernatant reacted with the Tir antisera to reveal a 80 kDa band, as well as some breakdown products. Molecular weight markers are in kDa.

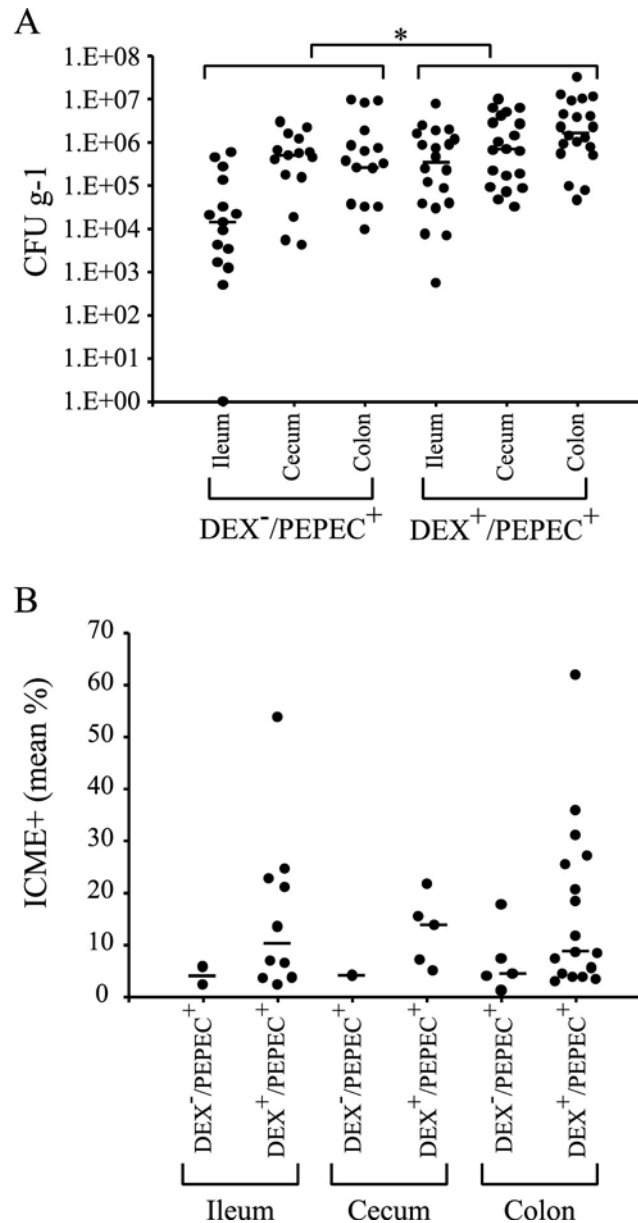


Figure 2. Dexamethasone significantly increases the bacterial colonization of O45-positive Nal^r bacteria ($P=0.008$) (A), and substantially increases the mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with intimately adherent bacteria (ICME+) in the ileum ($P=0.37$), cecum ($P=0.37$), and colon ($P=0.09$) of pigs experimentally challenged with the PEPEC strain ECL1001 (B). Extensive foci of intimately adherent bacteria were observed mostly in the ileum and colon of DEX⁺/PEPEC⁺ pigs, whereas only a few non-extensive foci of individual intimately adherent bacteria, with no obvious change in associated enterocytes were observed in DEX⁻

/PEPEC⁺ pigs (B). Results are presented as raw data (A) or as raw data among the A/E-positive pigs (B) with the horizontal bar as the median. A $P < 0.05$ was taken to be statistically significant.

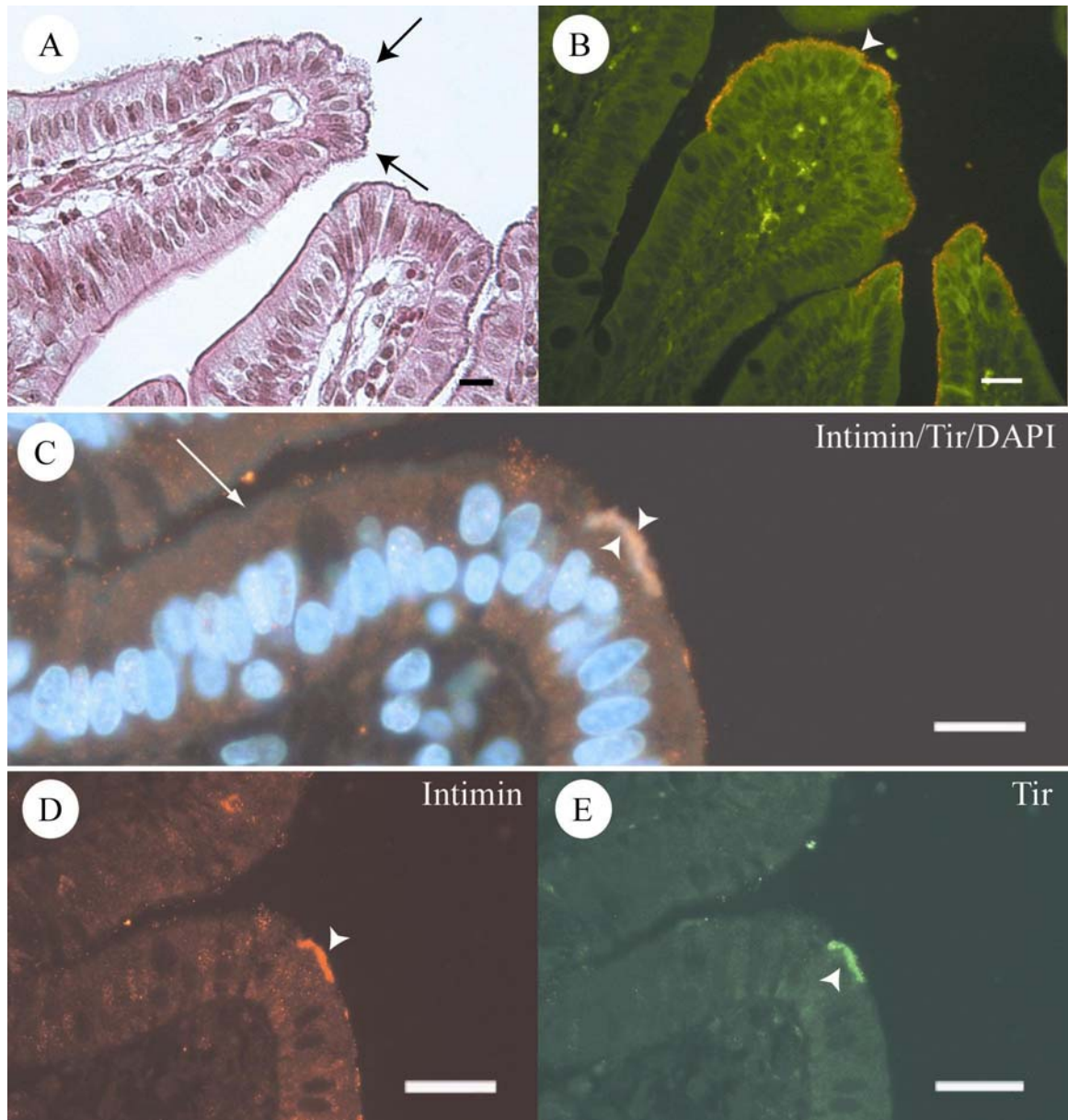


Figure 3. Representative HPS-stained ileal section of a DEX+/PEPEC+ pig, showing multiple foci of intimately adherent bacteria, and irregular enterocyte morphology (A, arrows). Further observation using rabbit anti-O45 and donkey anti-rabbit Rhodamine RedX conjugated antisera confirmed the presence of O45-positive bacteria (B, arrowhead) in foci of intimately adherent bacteria. Multi-labeled IFA of an ileal section from a DEX+/PEPEC+ pig, stained with 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ of DAPI allowed detection of intimately adherent bacteria (blue, arrow), together with red (Rhodamine RedX) and green (FITC) staining, corresponding to colocalised intimin and Tir

proteins beneath intimately adherent bacteria, respectively (C, arrowheads). Panels D and E show a separate scanning of the color channels to allow individual detection of either intimin (D, arrowhead) or Tir (E, arrowhead) on the same intestinal section. Bars = 50 (C), 100 (D, E) or 200 μm (A, B).

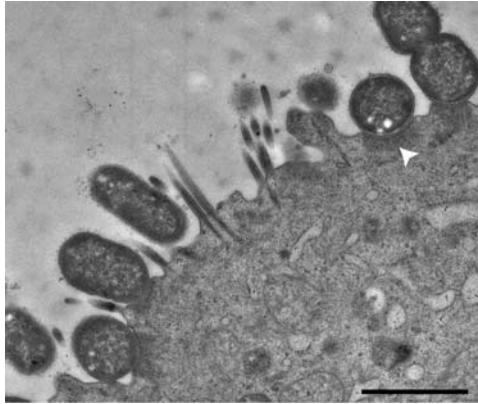


Figure 4. Representative TEM ileal tissue section of a DEX⁺/PEPEC⁺ pig showing extensive, typical A/E lesions with effacement of the microvilli, actin condensation (arrowhead) beneath intimately adhered bacteria, and formation of cup-like pedestals. Bar = 10 (A) μ m.

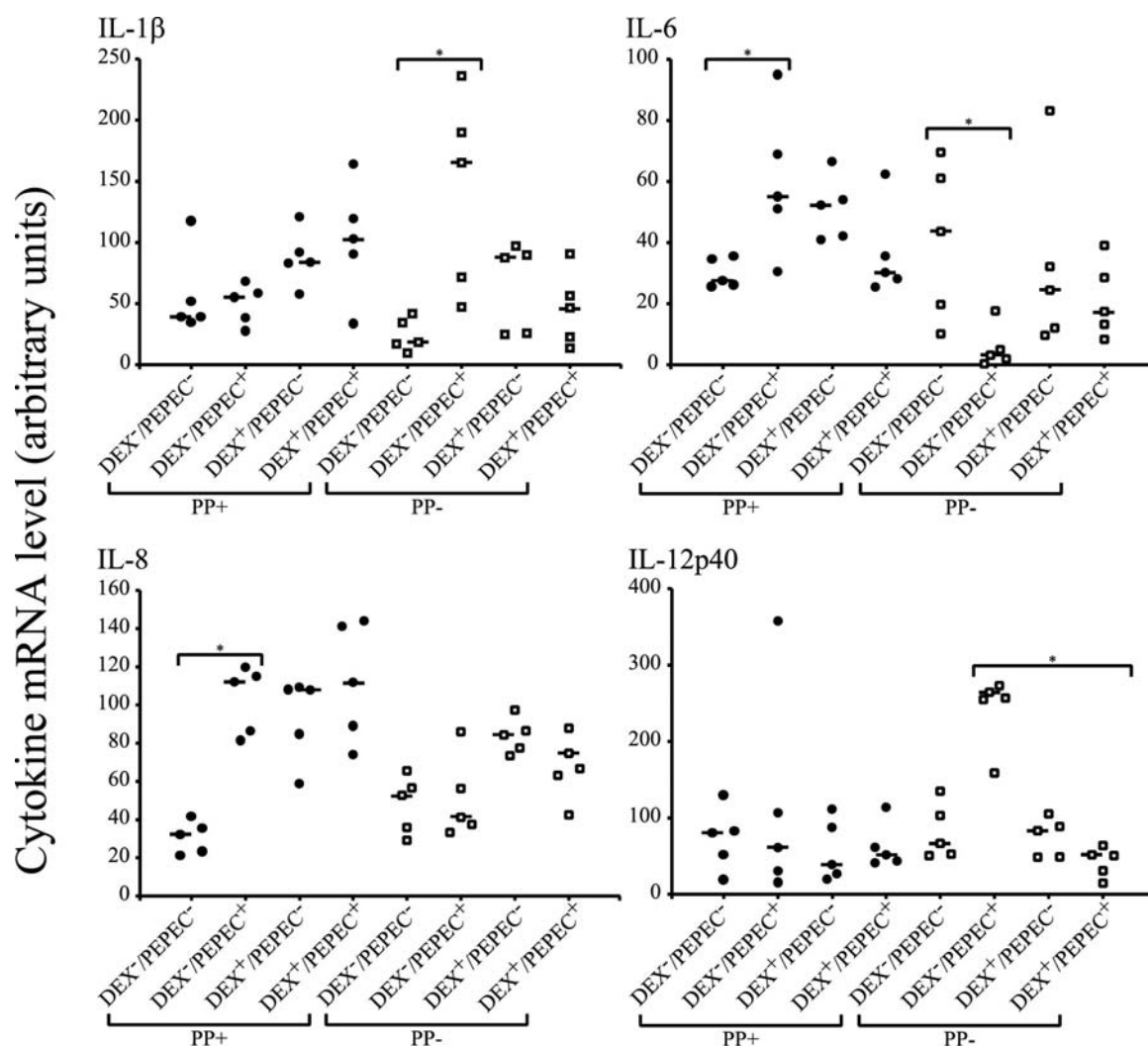


Figure 5. PEPEC strain ECL1001 induces the upregulation of the mRNA levels of IL-6 ($P=0.03$) and IL-8 ($P=0.01$) in non-treated, challenged weaned pigs (DEX-/PEPEC+), as compared to non-treated, non-challenged pigs (DEX-/PEPEC-), in Peyer's patch-containing ileum segments (PP+, ●). On the other hand, it induces the upregulation of the mRNA levels of IL-1 β ($P=0.02$) and, to a lesser extent of IL-12p40, in DEX-/PEPEC+ pigs, as compared to DEX-/PEPEC-, and the downregulation ($P=0.03$) of the mRNA levels of IL-6, in PP-lacking ileum segments (PP-, ■). Dexamethasone also exerts significant effects on the expression mRNA levels of IL-12p40 ($P=0.005$) in DEX+/PEPEC+ pigs, as compared to DEX-/PEPEC+ pigs. No other significant modulation of cytokine expression was observed. The DEX+/PEPEC- group represents unchallenged pigs treated with dexamethasone.

Results are presented as arbitrary units, and the horizontal bar indicates the median of each group. A $P < 0.05$ was taken to be statistically significant.

Table I. His-tagged fusion proteins used in this study

Gene	Primer	Primer sequence (5'-3') ^a	Amplicon size (bp)	Predicted molecular weight (kDa)	Reference
<i>eae</i>	F	<u>GGATCCAATGGTGAAAAT</u>	2712	95	This study
	R	<u>AAGCTTTTTTACACAAACAGG</u>			
<i>tir</i>	F	<u>GAGCTCATGCCTATTGGTAAT</u>	1626	80	This study
	R	<u>AAGCTTAACGAAACGTGCGG</u>			

^(a) Restriction sites are underlined.

Table II. Distribution of foci of intimately adherent bacteria in intestinal tissues from weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 following treatment or not with dexamethasone.

Treatment	Number of pigs (%)		Number of pigs (%) with A/E lesions in :		
	Total	A/E-positive	Ileum	Cecum	Colon
DEX ⁻ /PEPEC ⁺	15	7 (46.7)	2 (13.3)	1 (6.7)	5 (33.3)
DEX ⁺ /PEPEC ⁺	20	17 (85) [*]	10 (50)	5 (25)	17 (85) ^{**}

^{*}($P=0.003$), ^{**}($P=0.011$).

REFERENCES

- Adcock, I. M.** 2001. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther* **14**(3): 211-9.
- Allcock, G. H., M. Allegra, R. J. Flower and M. Perretti** 2001. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. *Clin Exp Immunol* **123**(1): 62-7.
- Batisson, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques and J. Harel** 2003. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(8): 4516-25.
- Beaudry, M., C. Zhu, J. M. Fairbrother and J. Harel** 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**(1): 144-8.
- Brunetti, M., N. Mascetra, N. Martelli, F. O. Ranelletti, P. Musiani and F. B. Aiello** 2002. Synergistic inhibitory activities of interleukin-10 and dexamethasone on human CD4⁺ T cells. *Transplantation* **74**(8): 1152-8.
- Cantey, J. R. and R. K. Blake** 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis* **135**: 454-62.
- Chakravortty, D. and K. S. Kumar** 1999. Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules. *Biochim Biophys Acta* **1453**(2): 261-72.

Chen, X., T. Murakami, J. J. Oppenheim and O. M. Howard 2004. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* **34**(3): 859-69.

Crawford, J. A. and J. B. Kaper 2002. The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **46**(3): 855-68.

Dalrymple, S. A., R. Slattery, D. M. Aud, M. Krishna, L. A. Lucian and R. Murray 1996. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **64**(8): 3231-3235.

Dean-Nystrom, E. A., J. F. Pohlenz, H. W. Moon and A. D. O'Brien 2000. *Escherichia coli* O157:H7 causes more-severe systemic disease in suckling piglets than in colostrum-deprived neonatal piglets. *Infect Immun* **68**(4): 2356-8.

Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente and B. B. Finlay 2003. *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol* **48**(1): 95-115.

Donnenberg, M. S., S. Tzipori, M. L. McKee, A. D. O'Brien, J. Alroy and J. B. Kaper 1993b. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**(3): 1418-24.

Dozois, C. M., E. Oswald, N. Gautier, J. P. Serthelon, J. M. Fairbrother and I. P. Oswald 1997. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. *Vet Immunol Immunopathol* **58**(3-4): 287-300.

Dziedzic, T., I. Wybranska, A. Dembinska-Kiec, A. Klimkowicz, A. Slowik, J. Pankiewicz, A. Zdzienicka and A. Szczudlik 2003. Dexamethasone inhibits TNF-

alpha synthesis more effectively in Alzheimer's disease patients than in healthy individuals. *Dement Geriatr Cogn Disord* **16**(4): 283-6.

Eckmann, L., M. F. Kagnoff and J. Fierer 1995. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol* **3**(3): 118-20.

Edwards, P. R. and W. H. Ewing 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co.: 82-105.

Feng, W.-H., S. M. Laster, M. Tomkins, T. Brown, J.-S. Xu, C. Altier, W. Gomez, D. Benfield and M. B. McCaw 2001. *In utero* infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol* **75**(10): 4889-95.

Fournout, S., C. M. Dozois, M. Odin, C. Desautels, S. Peres, F. Herault, F. Daigle, C. Segafredo, J. Laffitte, E. Oswald, J. M. Fairbrother and I. P. Oswald 2000. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect Immun* **68**(2): 839-47.

Galina, L., C. Pijoan, M. Sitjar, W. T. Christianson, K. Rossow and J. E. Collins 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* **134**(3): 60-4.

Hauf, N. and T. Chakraborty 2003. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Immunol* **170**(4): 2074-82.

Hecht, G., J. A. Marrero, A. Danilkovich, K. A. Matkowskyj, S. D. Savkovic, A. Koutsouris and R. V. Benya 1999. Pathogenic *Escherichia coli* increase Cl-

secretion from intestinal epithelia by upregulating galanin-1 receptor expression. *J Clin Invest* **104**(3): 253-62.

Hedges, S. R., W. W. Agace and C. Svanborg 1995. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol* **3**(7): 266-70.

Hélie, P., M. Morin, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45: K"E65" strain. *Infect Immun* **59**(3): 814-21.

Hu, X., W. P. Li, C. Meng and L. B. Ivashkiv 2003. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* **170**(9): 4833-9.

Inman, L. R. and J. R. Cantey 1984. Peyer's patch lymphoid follicle epithelial adherence of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* (strain RDEC-1). Role of plasmid-mediated pili in initial adherence. *J Clin Invest* **74**(1): 90-5.

Janke, B. H., D. H. Francis, J. E. Collins, M. C. Libal, D. H. Zeman and D. D. Johnson 1989. Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Invest* **1**: 6-11.

Jarvis, K. G. and J. B. Kaper 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**(11): 4826-9.

Jordan, D. M., V. Sperandio, J. B. Kaper, E. A. Dean-Nystrom and H. W. Moon 2005. Colonization of gnotobiotic piglets by a *luxS* mutant strain of *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **73**(2): 1214-16.

Knutton, S., J. Adu-Bobie, C. Bain, A. D. Phillips, G. Dougan and G. Frankel 1997. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun* **65**(5): 1644-52.

Ludwig, K., M. Bitzan, C. Bobrowski and D. E. Muller-Wiefel 2002. *Escherichia coli* O157 fails to induce a long-lasting lipopolysaccharide-specific, measurable humoral immune response in children with hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis* **186**(4): 566-9.

Ma, J., T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N. E. Miller, M. Hukkanen, G. F. Ma and Y. T. Konttinen 2003. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* **60**(11): 2334-46.

Ma, W., K. Gee, W. Lim, K. Chambers, J. B. Angel, M. Kozlowski and A. Kumar 2004. Dexamethasone inhibits IL-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells by down-regulating the activity of c-Jun N-terminal kinase, the activation protein-1, and NF-kappa B transcription factors. *J Immunol* **172**(1): 318-30.

MacDonald, T. T. and G. Monteleone 2001. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* **22**(5): 244-7.

McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Sonnenberg and J. B. Kaper 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(5): 1664-8.

McDaniel, T. K. and J. B. Kaper 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**(2): 399-407.

Mundy, R., L. Petrovska, K. Smollett, N. Simpson, R. K. Wilson, J. Yu, X. Tu, I. Rosenshine, S. Clare, G. Dougan and G. Frankel 2004. Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and roles of this and other secreted proteins in infection. *Infect Immun* **72**(4): 2288-2302.

Nabuurs, M. J. 1998. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. *Vet Q* **20 Suppl 3**: S42-5.

Nataro, J. P. and J. B. Kaper 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.

Nathan, C. and M. U. Shiloh 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(16): 8841-8.

Neish, A. S. 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect* **4**(3): 309-17.

Nieman, L. K. 2002. Diagnostic tests for Cushing's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **970**: 112-8.

Oswald, I. P., C. M. Dozois, R. Barlagne, S. Fournout, M. V. Johansen and H. O. Bogh 2001. Cytokine mRNA expression in pigs infected with *Schistosoma japonicum*. *Parasitology* **122**(Pt 3): 299-307.

Ottonello, G. A. and A. Primavera 1979. Gastrointestinal complication of high-dose corticosteroid therapy in acute cerebrovascular patients. *Stroke* **10**(2): 208-10.

Pampusch, M. S., A. M. Bennaars, S. Harsch and M. P. Murtaugh 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. *Vet Immunol Immunopathol* **61**(2-4): 279-89.

Phillips, A. D., S. Navabpour, S. Hicks, G. Dougan, T. Wallis and G. Frankel 2000b. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* **47**(3): 377-81.

Pritts, T., E. Hungness, Q. Wang, B. Robb, D. Hershko and P. O. Hasselgren 2002. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia--role of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg* **183**(4): 372-83.

Ramirez, K., R. Huerta, E. Oswald, C. Garcia-Tovar, J. M. Hernandez and F. Navarro-Garcia 2005. Role of EspA and intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. *Infect Immun* **73**(1): 103-13.

Roberts, R. F. and W. L. Roberts 2004. Performance characteristics of five automated serum cortisol immunoassays. *Clin Biochem* **37**(6): 489-93.

Rogler, G. and T. Andus 1998. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* **22**(4): 382-9.

Roy, M. J. and T. J. Walsh 1992. Histopathologic and immunohistochemical changes in gut-associated lymphoid tissues after treatment of rabbits with dexamethasone. *Lab Invest* **66**(4): 437-43.

Saklatvala, J. 2002. Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* **4**(3): 146-50.

Savkovic, S. D., A. Koutsouris and G. Hecht 1997. Activation of NF-kappa B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Am J Physiol Cell Physiol* **273**(4): C1160-7.

Schmaldienst, S. and W. H. Horl 1996. Bacterial infections during immunosuppression - immunosuppressive agents interfere not only with immune response, but also with polymorphonuclear cell function. *Nephrol Dial Transplant* **11**(7): 1243-5.

Simmons, C. P., N. S. Goncalves, M. Ghaem-Maghami, M. Bajaj-Elliott, S. Clare, B. Neves, G. Frankel, G. Dougan and T. T. MacDonald 2002. Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial pathogen, *Citrobacter rodentium*, in mice lacking IL-12 or IFN-gamma. *J Immunol* **168**(4): 1804-12.

Spahn, T. W. and T. Kucharzik 2004. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* **53**(3): 456-65.

Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin and J. B. Kaper 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(26): 15196-201.

Sperandio, V., A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro and J. B. Kaper 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(15): 8951-6.

Splichal, I., I. Trebichavsky, Y. Muneta and Y. Mori 2002. Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Vet Res* **33**(3): 291-7.

Stadnyk, A. W., G. R. Sisson and C. C. Waterhouse 1995. IL-1 alpha is constitutively expressed in the rat intestinal epithelial cell line IEC-6. *Exp Cell Res* **220**(2): 298-303.

Stagg, A. J., A. L. Hart, S. C. Knight and M. A. Kamm 2003. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* **52**(10): 1522-9.

Stoffregen, W. C., J. F. Pohlenz and E. A. Dean-Nystrom 2004. *Escherichia coli* O157:H7 in the gallbladders of experimentally infected calves. *J Vet Diagn Invest* **16**(1): 79-83.

Suarez, P. 2000. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. *Vet Res* **31**(1): 47-55.

Tanaka, H., N. Toyoda, E. Adachi and T. Takeda 2000. Immunologic evaluation of an *Escherichia coli* O157-infected pregnant woman. A case report. *J Reprod Med* **45**(5): 442-4.

Tsitoura, D. C. and P. B. Rothman 2004. Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4⁺ T cells. *J Clin Invest* **113**(4): 619-27.

Tzipori, S., H. Karch, K. I. Wachsmuth, R. M. Robins-Browne, A. D. O'Brien, H. Lior, M. L. Cohen, J. Smithers and M. M. Levine 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **55**(12): 3117-25.

Vallance, B. A., W. Deng, L. A. Knodler and B. B. Finlay 2002a. Mice lacking T and B lymphocytes develop transient colitis and crypt hyperplasia yet suffer impaired bacterial clearance during *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* **70**(4): 2070-81.

Vallance, B. A., W. Deng, M. De Grado, C. Chan, K. Jacobson and B. B. Finlay 2002b. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by the attaching and

effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* in infected mice. *Infect Immun* **70**(11): 6424-35.

Vallance, B. A., W. Deng, K. Jacobson and B. B. Finlay 2003. Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **71**(6): 3443-53.

van Woensel, J. B., R. Lutter, M. H. Biezeveld, T. Dekker, M. Nijhuis, W. M. van Aalderen and T. W. Kuijpers 2003. Effect of dexamethasone on tracheal viral load and interleukin-8 tracheal concentration in children with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* **22**(8): 721-6.

Wills, R. W., J. T. Gray, P. J. Fedorka-Cray, K. J. Yoon, S. Ladely and J. J. Zimmerman 2000. Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol* **71**(3-4): 177-92.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Donnenberg, M. Beaudry and J. M. Fairbrother 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**(10): 4153-9.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1995b. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* **59**(2): 118-23.

Contribution des auteurs à la réalisation de l'article 2

Francis Girard : a conçu et réalisé toutes les expériences décrites dans l'article 2, à l'exception des RT-PCR pour les cytokines, a analysé et interprété les résultats obtenus, et a rédigé le manuscrit.

Isabelle P. Oswald : a supervisé les travaux de Ionélia Taranu dans la réalisation des RT-PCR pour les cytokines, et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

Ionélia Taranu : a réalisé les analyses par RT-PCR et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

Pierre Hélié : a participé à l'analyse histopathologique des échantillons et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

Greg D. Appleyard : a réalisé la détection du SRRPV dans les échantillons, et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

Josée Harel : a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

John M. Fairbrother : a supervisé les travaux de Francis Girard et l'a orienté dans l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections apportées au manuscrit.

ARTICLE 3

Use of Virulence Factor-Specific Egg Yolk-Derived Immunoglobulins as a Promising Alternative to Antibiotic Treatment for Control of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Infections.

Francis Girard, Isabelle Batisson, Gabriela Martinez, Cynthia Breton, Josée Harel,
and John M. Fairbrother (2005).

Manuscrit soumis à FEMS Immunology and Medical Microbiology

17-Mar-2005

Dear Dr. John Fairbrother,

The manuscript you submitted to our journal, Use of Virulence Factor-Specific Egg Yolk-Derived Immunoglobulins as a Promising Alternative to Antibiotics for Prevention of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Infections, by Girard, Francis; Batisson, Isabelle; Martinez, Gabriela; Breton, Cynthia; Harel, Josee; Fairbrother, John, has been uploaded to Manuscript Central. As the submitting author, you will receive future communications via e-mail. Your manuscript number is FEMSIM-05-03-0047. We thank you for submitting your work for publication in one of the FEMS Microbiology journals. Please be sure to save the word processing and graphics files from your manuscript. You may need them later again for production purposes if your manuscript is accepted. You can keep track of your manuscript by logging on periodically to our site (<http://mc.manuscriptcentral.com/femsim>), where the status will be displayed in your Submitting Author Center.

Again, thank you for the submission of your manuscript.

Kindest regards,

Dr Montserrat Blázquez-Domingo, FEMS Editorial Administrator

On behalf of Chief Editor, Dr Alex van Belkum

FEMS Immunology & Medical Microbiology

Note: It is the responsibility of the corresponding author (or submitting author if different) that all authors of this submitted manuscript are informed about the submission and its progress.

Use of Virulence Factor-Specific Egg Yolk-Derived Immunoglobulins as a Promising Alternative to Antibiotics for Prevention of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Infections

Francis Girard¹, Isabelle Batisson¹⁻², Gabriela Martinez¹, Cynthia Breton¹, Josée Harel¹, and John M. Fairbrother^{1*}.

¹Groupe de recherche sur les maladies infectieuses du porc (GREMIP), Faculté de médecine vétérinaire, Université de Montréal, Saint-Hyacinthe, Québec, Canada.

²Université Blaise Pascal CLERMONT-II, Laboratoire de Biologie des Prostistes, CNRS UMR 6023, Aubière, France.

*Corresponding author: john.morris.fairbrother@umontreal.ca

Running title: IgY for the Prevention of AEEC Infections

Keywords: Attaching and effacing *Escherichia coli*, porcine intestinal IVOC, adherence, IgY, intimin, Tir, *in vivo*

ABSTRACT

Using a porcine ileal *in vitro* organ culture model, we have demonstrated that egg yolk-derived antibodies specific for the attaching and effacing *Escherichia coli* virulence factors intimin and Tir, but not those specific for the AEEC-secreted proteins EspA, EspB, and EspD, significantly reduced the bacterial adherence of the porcine enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strain ECL1001, formerly 86-1390. Moreover, antibodies specific for intimin and Tir also significantly reduced bacterial adherence of heterologous AEEC strains, including human, bovine and dog EPEC strains, as well as of O157:H7 Shiga toxin-producing *E. coli* strains in this model. In addition, we demonstrated that the oral administration of these anti-intimin antibodies significantly reduced the extent of attaching and effacing lesions found in the small intestine of weaned pigs challenged with the porcine EPEC strain ECL1001. Overall, our results underline the potential for the use of specific egg yolk-derived antibodies as a novel approach to prevention of AEEC infections.

INTRODUCTION

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) are an important cause of enteric disease in both humans and animals (Nataro et al. 1998). EPEC are the most common bacterial cause of diarrhea in infants from developing countries, whereas STEC, especially those of serotype O157:H7 (STEC_{O157:H7}), are important emerging pathogens causing foodborne infections leading to bloody diarrhea and hemolytic-uremic syndrome (HUS). EPEC and certain STEC cause typical intestinal attaching and effacing (A/E) lesions, characterized by intimate bacterial adherence to intestinal epithelial cells, effacement of brush border microvilli, F-actin rearrangement, and formation of a pedestal of polymerized F-actin and other cytoskeletal elements underneath the bacterial adherence site. Most A/E phenotype elements are encoded on a 35.6 kb (EPEC) to 43 kb (STEC_{O157:H7}) pathogenicity island called locus of enterocytes effacement (LEE) (McDaniel *et al.* 1995). The LEE contains genes encoding an outer membrane protein termed intimin, responsible for the intimate adherence; a type-III secretion system machinery including secreted proteins (EspA, EspB, EspD, and EspF) and a translocated intimin receptor (Tir); and many open reading frames with undetermined functions. Additional adhesins contribute to the pathogenesis of A/E *E. coli* (AEEC) infections, such as Efa1 (Stevens *et al.* 2002; Badea *et al.* 2003; Stevens *et al.* 2004), Bundle-forming pilus (BFP) (Bieber *et al.* 1998; Cleary *et al.* 2004), and the newly characterized Paa, which seems to be involved in the early stages of development of A/E lesions by porcine EPEC (PEPEC) (Batisson *et al.* 2003).

An increase in antimicrobial multiresistance among *E. coli* isolates, combined with an increasing number of outbreaks of STEC_{O157:H7} infections in developed countries and of EPEC infections in developing countries, has resulted in a real need for new prevention and treatment strategies. Passive immunization, as well as direct immunization of cattle with type-III secreted proteins (Potter *et al.* 2004), have been proposed as alternative approaches for the prevention and treatment of intestinal disorders induced by AEEC. Several studies have demonstrated the immunogenicity

of certain AEEC virulence factors, especially intimin, secreted proteins EspA and EspB, and intimin receptor Tir (Adu-Bobie *et al.* 1998b; Li *et al.* 2000; Parissi-Crivelli *et al.* 2000). The results of these studies also suggest that bacterial virulence factors that are inserted into host cells during infection by type III secretion systems are still recognized by the host immune response (Li *et al.* 2000).

The yolks of eggs from laying hens have been shown to be a convenient source of polyclonal antibodies. Birds produce three principal immunoglobulin (Ig) classes, IgM, IgA, and IgG, the latter, referred as IgY, being functionally homologous to mammalian IgG (Sharma 1997). Chicken egg yolk has previously been used as an inexpensive and effective source of IgY antibodies for the passive immunization or treatment of animals suffering from various bacterial and viral diseases, including enterotoxigenic F4(K88)+ (Marquardt *et al.* 1999) and F18ab+ (Imberechts *et al.* 1997) *E. coli* infections, *Helicobacter pylori* gastritis (Shin *et al.* 2002), dental caries due to *Streptococcus mutans* in humans (Smith *et al.* 2001), human rotavirus infection in mice (Ebina *et al.* 1990) and porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) infection in piglets (Kweon *et al.* 2000). Nevertheless, there has been no report to date on the use of IgY in the prevention and treatment of AEEC infections.

Hence, the aim of this study was to examine the ability of egg yolk-derived antibodies directed against various virulence factors of the PEPEC strain ECL1001 to inhibit intimate bacterial adherence of AEEC strains originating from various animal species and humans in a colostrum-deprived newborn piglet ileal *in vitro* organ culture (IVOC) model. Moreover, we evaluate the potential of anti-intimin antibodies to reduce intimate adherence of a PEPEC strain *in vivo* in weaned pigs.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains, plasmids and media. All the strains used in this study are listed in Table I. *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) was used as the host strain for recombinant proteins. The PEPEC strain ECL1001 (formerly 86-1390, streptomycin resistant, Sm^R) was isolated at the *Escherichia coli* Laboratory (EcL) of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal (Saint-Hyacinthe, Québec, Canada) from a 4-week-old pig with postweaning diarrhea. This strain, harboring intimin β , induces A/E lesions in both germfree, colostrum-deprived and conventional neonatal piglets (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b), and in conventional weaned pigs following treatment with dexamethasone (Girard F. *et al.*, accepted). The genomic DNA of the PEPEC strain ECL1001 was used as a template to amplify the appropriate virulence factor genes carried on the LEE. The strain ECL1001 Nal^r is a variant of strain ECL1001 that was obtained by its serial passage following growth in Luria Bertani (LB, Difco laboratories, Sparks, MD, USA) broth containing concentrations of nalidixic acid from 0 to 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ at 37°C for 24 h.

For IVOC segment inoculation, bacteria were grown overnight in Trypticase Soy Broth (TSB, Difco laboratories, Sparks, MD, USA) with agitation at 37°C, then transferred to Dubelcco's Modified Eagle's Medium (DMEM, GibcoBRL, Ontario, Canada) and grown to early exponential phase (OD₆₀₀ 0.7, corresponding to approximately 2.0×10^8 CFUs, determined by use of specific growth curves), as previously described (Batisson *et al.* 2003). It has been shown that bacteria grown for 3 hours in DMEM express LEE genes and are primed to produce A/E lesions (Collington *et al.* 1998b). A final concentration of 1% D-Mannose was added to each broth culture to minimize Type 1 fimbriae-mediated adherence. All the AEEC strains used in this study have previously been shown to adhere to and to induce A/E lesions in the colostrum-deprived newborn piglet ileal IVOC model (Table I) (Girard F. *et al.*, accepted).

Construction of fusion genes. The *eae*, *espA*, *espB*, *espD* and *tir* genes of the PEPEC strain ECL1001 were amplified by PCR using primer pairs listed in Table II. The amplicons were inserted into the pGEM-T vector (Promega Corporation, Madison, WI, USA) and then introduced into the pQE-30 expression vector (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) using appropriate cloning sites (*Bam*HI or *Sal*I sites for *espA*, *espB*, and *espD*, *Bam*HI or *Sph*I for *eae*, and *Hind*III or *Sac*I for *tir*). Gene fusions were confirmed by sequencing.

Production and purification of fusion proteins. An overnight LB broth pre-culture was used to inoculate a fresh LB broth. Isopropylthiogalactoside (IPTG) at a final concentration of 1mM was added when the cells reached an OD₆₀₀ of 0.7-0.8. After 3 hours of incubation, cells were harvested by centrifugation at 4000 x *g* for 10 minutes. The pellet was stored at -70°C until use. Bacterial lysis and protein purification were carried out following manufacturer's recommendations (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada) in native and denaturing conditions using an Ni-NTA resin column. The buffer containing 0.25 M imidazole was used for elution in native conditions. In contrast, 8M of urea was added to the elution buffer, when denaturing conditions were used. In both cases, the obtained fractions were verified by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), quantified by the Lowry method, and stored at -70°C.

Detection of His-tagged proteins, secreted proteins, and intimin expression by western immunoblotting. To promote secretion of Tir, EspA, EspB and EspD, bacterial strains to be assessed in the porcine ileal IVOC model were grown overnight in minimal essential medium (MEM, GibcoBRL, Ontario, Canada), transferred to 40 ml of fresh MEM, and incubated at 37°C with agitation to an optical density (OD) at 600 nm of 1.0, as previously described (Jarvis et Kaper 1996; Crawford et Kaper 2002). Bacteria were pelleted by centrifugation, and phenylmethylsulfonyl fluoride (50 µg ml⁻¹; Sigma Chemical Co., St-Louis, USA), aprotinin (0.5 µg ml⁻¹; Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany), and EDTA (0.5 µM; Sigma Chemical Co., St-Louis, USA) were added to the supernatant. Proteins were precipitated by the addition of 10 % trichloroacetic acid (TCA, Sigma

Chemical Co., St-Louis, USA) overnight at 4°C. After centrifugation at 4000 x *g* for 1 hour, protein pellets were washed with cold 95% ethanol and re-centrifuged at 4000 x *g* for 1 hour. Pellets were resuspended in 450 µl of Laemmli buffer and boiled for 5 minutes. Samples were further analyzed by SDS-PAGE (10% acrylamide for Tir, 12% for EspB and EspD, 15% for EspA).

To promote intimin expression, overnight TSB cultures were diluted 1:100 in fresh DMEM and incubated for three hours at 37°C with agitation. An equivalent of an OD₆₀₀ of 0.1 was loaded onto 8% SDS-PAGE gels, as previously described (Knutton *et al.* 1997).

Purified His-tagged proteins were analyzed on 15% SDS-PAGE gel and their reactivity with RGS-His mouse monoclonal antibody (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada), as well as with either rabbit polyclonal (EspA and EspB) or mouse monoclonal (EspA, EspB, EspD, Tir and intimin) antibodies, was tested by western immunoblotting. For evaluation of specific chicken IgY antibody production and for the detection of secreted proteins and intimin expression, purified IgY directed against each of the virulence factors was used as the primary antibody. Goat anti-rabbit, goat anti-mouse or rabbit anti-chicken HRP-conjugated IgG were used (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), depending on the case, as secondary antibody. The reaction was visualized using 4-chloro-1-naphthol and H₂O₂ as substrate (Sigma Chemical Co., St-Louis, USA).

Immunization of animals and antibody purification. Two to eight 25-week-old laying hens were immunized in their pectoral muscle in two sites with 50 µg of each purified protein emulsified in incomplete Freund's adjuvant, on days 1, 14, 28 and 42. Hens immunized with a sonicate of total proteins from M15(pREP4) or non-immunized hens were used as negative controls for anti-virulence factor IgY production. Eggs were collected from day 28 and kept at 4°C until purification of antibodies was carried out. IgY was extracted from egg yolks by the method described by Akita and Nakai (Akita et Nakai 1993b), with some modifications (Batisson *et al.* 2003). The water-soluble fraction containing IgY was recovered,

lyophilized and conserved at 4°C until use. Purified IgYs were electrophoresed on SDS polyacrylamide gels and stained with Coomassie blue. The ability of each antibody to detect its corresponding His-tagged protein was verified by western immunoblotting as described above. Total IgY concentration (in mg proteins ml⁻¹ of Phosphate buffered saline, PBS) was measured taking into consideration that a 1.0 mg ml⁻¹ solution of IgY has an absorbance of 1.4 at OD₂₈₀ (Shin *et al.* 2002).

ELISA. Titers of anti-virulence factor IgY in egg yolks were determined by ELISA using the procedure of Gottschalk *et al.* (Gottschalk *et al.* 1998). Wells of Immulon 2 HB microtiter plates (Thermo Labsystems, Franklin, MA, USA) were coated overnight with 100 ng of purified proteins in carbonate buffer, pH 9.6. Purified IgY or an emulsion of whole eggs were two-fold serial diluted in PBS (pH 7.4) containing 0.05% Tween-20 and added to the wells. Bound antibodies were detected by adding rabbit anti-chicken IgY (1/25000) conjugated to peroxidase (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc., USA). After a 10 minute enzyme reaction with 2,2'-azino-di-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) peroxidase substrate (ABTS) in a dark chamber, the absorbance at 405 nm was read. The purified (as indicated below) anti-intimin IgY preparations were used as standards. The anti-intimin IgY titer obtained from the eggs was calculated after extrapolation of the absorbance reading in a linear regression curve constructed using the standard.

Collection and culture of porcine ileal IVOC segments. Adherence of isolates was examined as described previously (Zhu *et al.* 1995b; Batisson *et al.* 2003). Briefly, ileal IVOC segments were placed mucosal side up onto biopsy foam pads (Curtin Matheson Scientific, Inc., Texas, USA) in multidish four-well Nunclon Delta Surface tissue culture plates (Invitrogen life technologies, Burlington, Ontario, Canada). Complete RPMI 1640 medium was added to each well, and segments were inoculated three times at hourly intervals with 50 µl of broth culture applied to the mucosal surface, and incubated at 37°C on a rocker in a 95%-O₂ and 5%-CO₂ atmosphere for 8 hours. To prevent bacterial overgrowth and resulting acidic pH of the culture medium, hourly changes with sterile fresh complete RPMI 1640 medium were carried out during culture, starting 2 hours after initial inoculation of segments.

Non-infected segments were also cultured to confirm that no external contamination occurred during the experimental process. Each isolate was tested in segments from at least 2 piglets. After culture, IVOC segments were thoroughly rinsed in sterile PBS and fixed in 10% buffered formalin for histopathologic examination.

Adherence inhibition studies in the porcine ileal IVOC model. The antibody preparations had been reconstituted with PBS and filtered through a 0.22 μm membrane prior to use. Broth cultures of the tested strains were incubated at 37°C for 30 minutes with the appropriate antibody preparation, adjusted to give a final total IgY concentration of approximately 5 mg proteins ml^{-1} . The bacteria-IgY mixtures were inoculated onto ileal IVOC segments, as previously described for anti-Paa (Batisson *et al.* 2003) and anti-*H. pylori* antibodies (Shin *et al.* 2002). For determination of adherence inhibition antibody titers, two-fold serial dilutions of antibodies were prepared and added to the broth culture for a 30 minute contact period prior to inoculation of segments. Antibody preparations from hens immunized with a sonicated preparation of the host strain M15 (pREP4) (anti-M15) were used as a negative control for inhibition.

***In vitro* growth inhibition assay.** Overnight TSB cultures of the Nal^r variant of the PEPEC strain ECL1001 were diluted 1:100 in sterile DMEM and incubated with anti-intimin or anti-M15 antibodies (adjusted to a final total IgY concentration of 5 mg protein ml^{-1} each) for 8 h at 37°C at 150 rpm. At one hour intervals, 100 μl of culture was sampled, 10-fold serially diluted with sterile PBS, inoculated onto MacConkey agar medium containing 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ nalidixic acid, using a Spiral Plater apparatus (Spiral Systems Inc, Cincinnati, USA), and incubated overnight at 37°C. Lactose-positive colonies were counted and results for the Nal^r variant of strain ECL1001 alone or incubated with anti-intimin or anti-M15 antibodies were compared.

Preparation of antibodies for feeding to weaned pigs. Raw eggs containing the anti-intimin antibodies, or from non-immunized chickens, were spray dried, using an inlet temperature of 185°C, and an outlet temperature of 72°C. The specific

antibody titers were tested by ELISA before and after this procedure. The spray-dried egg powder was then coated using fatty acids of vegetable source, a JEFAGRO Technologies Inc. product, developed by JEFO Nutrition (JEFO Nutrition Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada), in a ratio of 1:2.3. The equivalent of 3 g of spray-dried egg powder (containing or not the specific antibodies) was fed to each pig daily during *in vivo* experiments.

Experimental challenge and antibody inhibition studies in weaned pigs. A total of sixty weaned pigs from a conventional, certified porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSv)-negative herd were used in four separate experiments. Briefly, pigs weaned at 17 days of age were randomly assigned to the appropriate groups in each experiment. Pigs were fed *ad libitum* with a solid granular antibiotic-free diet containing 19% soybean protein and water. All pigs received dexamethasone (Pharmascience Inc., Montreal, Canada) administered orally at a daily dose of 3 mg kg⁻¹ starting three days before the first bacterial challenge (D3) and continuing until necropsy (D10). Pigs received one of the following treatments from day 4 until necropsy: coated spray-dried egg powder from non-immunized chickens (Non-immunized, group 2, n=20), coated spray-dried egg powder containing anti-intimin IgY (Anti-intimin, group 3, n=20), or no treatment (None, group 1, n=20). On days D6, D7, D8, and D9, pigs received 10 ml of 1.2% CaCO₃ through an intraoesophageal tube, to neutralize gastric acid, followed by 1 ml of 1.0 x 10¹⁰ CFU of the Nal^r variant of the PEPEC strain ECL1001 in 9 ml of Trypticase Soy Broth (TSB, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA). Some pigs had demonstrated Nal^r *E. coli* colonies on fecal cultures prior to bacterial challenge, although all colonies were intimin-negative by PCR. Pigs were monitored daily and general appearance, attitude, dehydration, food and water intake, as well as presence of diarrhea, were evaluated in accordance with the Guidelines of the Canadian Council for Animal Care.

Necropsy procedure. On D10, pigs were sedated by intramuscular injection of a mixture of 10 mg kg⁻¹ of ketamine hydrochloride (Biomeda-MTC, Ontario, Canada) and 20 mg kg⁻¹ of xylazine (Bayer, Ontario, Canada) before being euthanized by an intracardiac injection of sodium pentobarbital (540 mg ml⁻¹;

Pharmacie, Faculté de médecine vétérinaire, Quebec, Canada). Necropsies were performed and a portion of each of the mid-jejunum, the last 5 centimeters of the distal ileum, as well as the antral part of the cecum and mid-spiral colon were collected and immediately fixed in 10% neutral-buffered formalin for examination by light microscopy. Additional portions of each tissue were placed on ice for bacteriological examination. Three colonies from MacConkey agar plates of each intestinal segment from each pig were randomly tested by slide agglutination using rabbit anti-O45:K"E65" serum, to confirm the presence of the challenge strain ECL1001 NaI^r.

Histopathology. Formalin-fixed tissues were processed, paraffin-embedded, sectioned at 5 μ m, and stained with hematoxylin, phloxine, and safranine (HPS) according to standard techniques. HPS-stained sections were examined by light microscopy and quantification of typical A/E bacteria on intestinal cells was carried out as previously described (Batisson *et al.* 2003), with modifications. Briefly, the regions of mucosal epithelium located between adjacent crypts (designated the inter-crypt mucosal epithelium, ICME) were examined for the presence of intimately adherent bacteria, either in large aggregates or a single layer, and the mean percentage of examined ICME demonstrating intimate-adherent bacteria per section was calculated. Each result is from at least 10 ileal IVOC segments or 40 ICME (*in vivo* experiments). In *in vivo* experiments, the jejunum and ileum results were grouped as "small intestine", and the cecum and colon results were grouped as "large intestine", and mean percentage was calculated for each part of the intestine of each pig.

Statistical analysis. Results are presented as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean, or as raw data with the median. A Kruskal-Wallis test was performed with commercially available software (SAS 8.1, SAS Institute, Cary, North Carolina, USA), and post hoc 2-by-2 comparisons were done to assess differences between the groups; $P < 0.05$ (IVOC experiments) or $P < 0.1$ (*in vivo* experiments) was taken to be significant.

RESULTS

His-A/E virulence factor fusion proteins are antigenic and immunogenic.

Production and purification of hybrids were analyzed by western immunoblotting using RGS-His antibody, as well as mouse monoclonal (EspA and EspB) and rabbit polyclonal (EspA, EspB, EspD, Tir, intimin) antibodies. For intimin and EspD, the anti-His and anti-virulence factor antibodies both revealed one major protein band at the appropriate molecular weight, whereas anti-EspA, anti-EspB and anti-Tir, and anti-His, revealed a major protein band at the appropriate molecular weight, as well as some breakdown products (data not shown).

All of the immunized chickens developed high specific antibody titers which ranged from $\text{Log}_{10}3.6$ for EspA antibodies to $\text{Log}_{10}4.5$ for Tir antibodies, at 6 weeks following initial immunization, as measured by ELISA (data not shown). Analysis of the sera by western immunoblotting using the corresponding purified proteins demonstrated that all antibodies were specific for the protein against which they were raised (data not shown).

Virulence factor-specific chicken antisera recognize the corresponding protein in both the homologous and heterologous AEEC strains. We initially tested the capacity of the chicken antisera to detect their corresponding proteins in whole-cell extracts and/or the supernatant of homologous and heterologous AEEC strains used in this study. Anti-intimin antiserum reacted with a 94-97 kDa band corresponding to intimin in whole-cell extracts of all the strains examined (Fig. 1). Anti-Tir, anti-EspA, anti-EspB, and anti-EspD antisera reacted with their corresponding secreted proteins for all the strains assessed, although only weak signal was obtained for anti-EspD antiserum (Fig. 1). None of the antisera used in this study reacted with the *E. coli* K-12 control strain MG1655. These results demonstrated the suitability of the various antibodies for use in adherence inhibition studies.

Intimin- and Tir-, but not EspA-, EspB-, and EspD-specific antibodies reduce intimate adherence of homologous PEPEC strain ECL1001 in porcine ileal IVOC. Anti-intimin and anti-Tir specific egg yolk antibodies significantly reduced ($P<0.0001$) the mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium (ICME+) showing intimate adherence, up to 62% (Fig. 2), as compared to the anti-M15 negative control, in ileal IVOC segments inoculated with PEPEC strain ECL1001 harboring intimin β . Treatment with the anti-M15 antibodies gave similar results to those following treatment with egg yolk total antibodies from non-immunized hens (data not shown). Anti-EspA, -EspB, and -EspD antibodies did not significantly reduce mean percentage of ICME showing intimate adherence in ileal IVOC segments inoculated with the PEPEC strain ECL1001 (Fig. 2).

In addition, anti-intimin antibodies could be diluted up to 2048 times ($P<0.0001$) before losing their ability to significantly reduce the percentage of ICME showing intimate adherence of PEPEC strain ECL1001, whereas anti-Tir antibodies significantly ($P<0.0001$) reduced the percentage of ICME showing intimate adherence of PEPEC strain ECL1001 only up to a two-fold dilution of 1:128 (data not shown).

Intimin-, Tir-, and EspA-, but not EspB-, and EspD-specific antibodies reduce intimate adherence of heterologous EPEC strains, in porcine ileal IVOC. Anti-intimin and anti-Tir specific egg yolk antibodies significantly reduced ($P<0.0001$) the mean percentage of ICME showing intimate adherence, up to 55 %, as compared with anti-M15 antibodies, when added to porcine ileal IVOC segments inoculated with either the human EPEC strain E2348/69, harboring intimin α (Fig. 3A), the bovine EPEC isolate ECL1020, harboring intimin ϵ (Fig. 3B), or the dog EPEC strain ECL1019, harboring intimin δ (Fig. 3C). In addition, anti-EspA antibodies significantly reduced ($P<0.0001$) the mean percentage of ICME showing intimate adherence in porcine ileal IVOC segments inoculated with the human EPEC strain E2348/69 (Fig. 3A) but not in those inoculated with strain ECL1020 (Fig. 3B) or ECL1019 (Fig. 3C). Anti-EspB, and anti-EspD antibodies did not significantly

reduce mean percentage of ICME showing intimate adherence in porcine ileal IVOC segments inoculated with any of the tested EPEC strains (Fig. 3).

Intimin- and Tir-, but not EspA-, EspB-, and EspD-specific antibodies reduce intimate adherence of human STEC_{O157:H7} in porcine ileal IVOC. Anti-intimin and anti-Tir specific egg yolk antibodies significantly reduced ($P<0.0001$) the mean percentage of ICME showing intimate adherence up to 72 %, as compared with anti-M15 antibodies, when added to porcine ileal IVOC segments inoculated with either of the human STEC_{O157:H7} strains 85-170 (Fig. 4A) or STJ348 (Fig. 4B), both harboring intimin γ . Anti-EspA, anti-EspB, and anti-EspD antibodies did not significantly reduce mean percentage of ICME showing intimate adherence in ileal IVOC segments inoculated with either of the STEC_{O157:H7} strains (Fig. 4).

Oral administration of specific anti-intimin antibodies reduces intimate adherence of PEPEC strain ECL1001 Nal^r in the ileum of weaned pigs. We initially investigated whether the antibody preparations could inhibit the bacterial growth of the Nal^r variant of the PEPEC strain ECL1001 in *in vitro* culture conditions, to ensure that any effect observed in the intestine was not on bacterial growth but rather on the interaction between intimin and Tir or other relevant host cell receptors.

Neither anti-intimin, nor anti-M15 antibodies, when added to yield a final total IgY concentration of 5 mg proteins ml⁻¹, exerted significant effects on the growth of the PEPEC strain ECL1001 Nal^r *in vitro* (data not shown).

Oral administration of coated spray-dried egg powder containing intimin-specific antibodies resulted in a significantly reduced mean percentage of ICME showing severe (higher than 10% ICME) intimate adherence in the small intestine ($P=0.069$), as compared to oral administration of coated spray-dried egg powder from non-immunized, conventional hens or to no treatment, in pigs subsequently challenged with PEPEC strain ECL1001 Nal^r (Fig. 5). No significant differences were observed between the groups in the large intestine (data not shown).

DISCUSSION

In this study, we demonstrated that the use of egg yolk-derived immunoglobulins directed against certain of the virulence factors of the PEPEC strain ECL1001 not only significantly inhibited, in a dose-dependent manner, adherence of the homologous PEPEC strain ECL1001, but also significantly inhibited adherence of various AEEC strains including EPEC isolated from cattle, dogs, and humans, and of STEC_{O157:H7} strains, in the porcine ileal IVOC model. Moreover, we demonstrated that oral administration of anti-intimin antibodies is a promising strategy for the prevention of AEEC infections in weaned pigs.

More specifically, our results demonstrated that the antibodies targeting intimin and its translocated receptor Tir were the most effective for the inhibition of the intimate adherence mediated by AEEC. These antibodies also significantly reduced bacterial adherence of AEEC strains from a wide range of origins and harboring different intimin subtypes, in the porcine ileal IVOC model. It is of particular interest that these antibodies significantly reduced the bacterial adherence of the STEC_{O157:H7} strains. Indeed, the normal intestinal microflora of cattle is the most relevant reservoir of A/E+ STEC strains (Gonzalez Garcia 2002), including the most prevalent serogroups among STEC, such as O26, O111 and O157. O157:H7 is the most relevant serotype in foodborne outbreaks, and such infections can be spread through contaminated food, drinking water or fruit juices, or swimming water, and from person to person. A recent study demonstrated that STEC_{O157:H7} isolates harboring *eaeA*, *stx1* and *stx2* genes can also be isolated from 2 % of intact colon fecal samples of swine in the USA and other countries (Feder *et al.* 2003), representing an additional source of risk of foodborne contamination in humans. In addition, EPEC are the most common bacterial cause of diarrhea in infants from developing countries (Nataro et Kaper 1998). Hence, a potential use for the coated spray-dried egg powder containing these specific anti-intimin and/or anti-Tir antibodies could be as a feed additive for cattle and pigs with the aim of reducing the reservoir of STEC_{O157:H7} and other A/E+ STEC, reducing the risks of foodborne

infections due to contaminated ground beef or pork, and water. Such a passive immunotherapy approach could also be used to prevent bacterial colonization, the development of A/E lesions, and diarrhea in postweaning pigs, young dogs, rabbits, and infants in developing countries.

In natural cases of AEEC infections in humans, specific antibodies against intimin, EspA, and EspB can be found in the colostrum and sera of mothers and the sera of children up to 6 months of age (Parissi-Crivelli *et al.* 2000). On the other hand, pediatric patients with acute diarrhea caused by STEC_{O157:H7} strains showed little reaction to EspA, EspB, and intimin in the acute-phase sera, although there was some reactivity to Tir (Li *et al.* 2000). These findings suggest that such bacterial proteins are potential vaccine candidates for preventing disease due to STEC_{O157:H7} and EPEC, and our results strengthen such a hypothesis.

EspA is a major component of a large extracellular filamentous appendage (EspA filament) on the surface of EPEC which appears transiently during A/E lesion formation, forming a direct link between the bacterium and the host cell surface (Knutton *et al.* 1998; Wolff *et al.* 1998). It has been implicated in initial adherence of EPEC *in vitro* and in the human IVOC model (Cleary *et al.* 2004). Moreover, the EspA filament is required for the translocation of Tir (Kenny *et al.* 1997b) and EspB into infected host cells (Knutton *et al.* 1998). EspA, EspB, and EspD stimulate host cell signal transduction events required for A/E lesion formation (Donnenberg *et al.* 1993a; Kenny *et al.* 1996; Lai *et al.* 1997).

Surprisingly, the anti-EspA antiserum raised against EspA protein of the PEPEC strain ECL1001 recognized the EspA protein of all the AEEC strains used in this study, including STEC_{O157:H7}. This finding is not consistent with those of the study of Neves *et al.*, in which these authors demonstrated that EspA_{EPEC} and EspA_{STEC} antisera failed to recognize EspA appendages from STEC and EPEC, respectively, even though the predicted amino acid sequence of EspA_{EPEC} shows high identity with that of EspA_{STEC} (Neves *et al.* 2003). Our finding could reflect the high identity (97%) of the predicted amino acid sequence observed between PEPEC of

O45 serotype, including the PEPEC strain ECL1001, and STEC of O26 serotype, rabbit EPEC, and rabbit strain RDEC-1, although lower identity was observed with EPEC strain E2348/69 (85%) and dog EPEC (75%) (An *et al.* 2000). The ability of the anti-EspA antiserum raised in our study to recognize both EPEC and STEC EspA proteins is surprising, but could also be consistent with the “atypical” nature of the PEPEC strain ECL1001 itself. Indeed, this strain is LEE+, BFP-, does not exhibit the localized adherence (LA) phenotype *in vitro*, possesses a truncated version of the *efa1* gene (Lemoine M. *et al.*, personal communication), as for STEC_{O157:H7} (Stevens *et al.* 2002; Badea *et al.* 2003; Stevens *et al.* 2004), and is negative for all Stx toxin genes (Hélie *et al.* 1991 ; Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b; Zhu *et al.* 1996; Higgins *et al.* 1997).

Interestingly, anti-EspA antibodies significantly reduced adherence of the human EPEC strain to the epithelial cells of porcine ileal IVOC segments, but not of the homologous PEPEC strain, or any other strain used in this study. These findings support the previously identified adhesive role for EspA in initial attachment by typical EPEC to the brush border of human pediatric IVOC segments, although the EspA filament appears to serve as a more important initial attachment factor in atypical EPEC which lack BFP (Cleary *et al.* 2004). Our results could indicate heterogeneity in the EspA appendage and its function among EPEC strains, as was observed with EPEC strain O55:H6, believed to be the ancestral serotype from which STEC_{O157:H7} emerged (Neves *et al.* 2003). Our results also suggest that the EspA filament may only play an accessory role as an adhesin, not being the only structure involved in initial adherence of these strains. Indeed, the presence of other fimbriae, adhesins or adherence-conferring molecules at the surface of these strains, such as BFP (Cleary *et al.* 2004) and Paa for PEPEC and STEC_{O157:H7} (Batisson *et al.* 2003); Efa1/LifA (Stevens *et al.* 2002; Badea *et al.* 2003) and ToxB in A/E+ STEC (Tatsuno *et al.* 2001), and long-polar fimbriae (Newton *et al.* 2004), as well as not yet characterized molecules, may diminish the need for the EspA filament as an adhesin in initial adherence of EPEC and STEC to the epithelial cells.

EspB and EspD are thought to be pore-forming proteins which are translocated via the EspA appendage, before being host cell-surface expressed (Wolff *et al.* 1998; Warawa *et al.* 1999). These data may help to explain the results obtained using anti-EspB and EspD antibodies. As antibodies were added in the early stages of the development of A/E lesions on the mucosal surface of the ileal IVOC segments, these secreted proteins may have already translocated into the host cell, making them less accessible to antibodies. Moreover, as we strictly focused on the adherence phenotype, our results indicate that these secreted proteins probably do not play a direct role in the adherence of the strains assessed in this study.

We also demonstrated the ability of orally administered coated spray-dried egg powder containing specific anti-intimin antibodies to reduce the severity of A/E lesions in the small intestine of weaned pigs challenged with a PEPEC strain. Due to the relatively high variation in ICME with intimate adherence, the statistical analysis was less conclusive than hoped. Hence, further pig challenge and protection studies should lead to a more definitive confirmation of our hypothesis. The absence of significant effects in the large intestine could be explained, in part, by the coating process used in this study. Indeed, the coating technology used in this study consisted of micro-granules made up of fatty acids of vegetable source and a silica support (the Sipernat 22S “Degussa” product), allowing slow and controlled release of the active components only when in contact with intestinal secretions (www.jefo.ca/jefagro/technology.html 2005). This coating technology is currently used for some commercial formulations, such as Tetracid 500™ micro-granule structure, a protected acidifier for pig feeds (JEFO Nutrition Inc., St-Hyacinthe, Quebec, Canada). As similar coating technologies have been shown to be released at mostly neutral pH (Piva *et al.* 1997), and as the small intestinal content, particularly that of the jejunum and the ileum, exhibits a pH ranging from 5.6 to 6.5 (Piva *et al.* 1997), it could be speculated that the antibodies were mostly released in the small intestine, where they were able to interact with bacteria locally, but were less available or active in the large intestine, possibly due to inactivation or destruction by proteases during their passage from the small to the large intestine (Adegoke *et al.* 2003).

Our results also suggested that the effects observed in pigs fed coated spray-dried egg powder containing anti-intimin antibodies are specific. This is supported by the *in vitro* inhibition assay results, where no effects on the growth rate of the PEPEC strain ECL1001 were observed, suggesting that antibodies interfered with the interaction between intimin and Tir or other relevant host cell receptors (Frankel *et al.* 1996; Sinclair et O'Brien 2002; Sinclair et O'Brien 2004), rather than on growth of the bacteria in the intestine. It also strengthens our previous arguments that the expression of intimin is a relevant mechanism in the pathogenesis of PEPEC infections *in vivo* in the weaned pig (Girard F. *et al.*, accepted).

To our knowledge, our results represent the first report of immunotherapy using egg yolk-derived immunoglobulins raised against recombinant virulence factors of AEEC. Moreover, we have demonstrated the ability of antibodies raised against the entire intimin β of a PEPEC strain, to successfully inhibit the intimate bacterial adherence of strains harboring any of the other four major intimin subtypes found among AEEC, including intimin γ of STEC_{O157:H7}. Our data also demonstrate that spray-dried egg powder containing anti-intimin antibodies can reduce the severity of A/E lesions, when fed to weaned pigs challenged with a PEPEC strain. The encouraging results of this study indicate that IgY obtained from hens immunized with virulence factors of AEEC may provide a novel approach for the management of AEEC infections in animals and humans.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to thank Dr Gad M. Frankel and Dr Frank Ebel for kindly providing us some of the antibodies used for western immunoblotting, and Guy Beauchamp for statistical analysis. This work was supported by grants to JMF and JH by Fonds Québécois de la Recherche sur la Nature et les Technologies (FQRNT) grant 0214, by the Natural Sciences Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 215841-98, by a Programme de soutien aux initiatives internationales de recherche et d'innovation (PSIIRI) of the Ministère du développement économique et régional et de la recherche du Québec grant E-Coli-PAFCST-019, by Gestion Univalor, limited partnership grant VAL-244-UM, by the Fonds du Centenaire of the Faculté de médecine vétérinaire of the Université de Montréal, and by a European Commission grant QLK2-2000-00600. This work was presented, in part, at the 103rd General meeting of the American Society for Microbiology, Washington, USA, May 2003.

Table I. Bacterial strains, and characteristics.

Bacterial strains	Description and origin	Serotype	Intimin subtype	Origin and reference
M15 (pREP4)	<i>E. coli</i> host strain for recombinant proteins	NA	NA*	Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada)
MG1655	<i>E. coli</i> K-12 strain	NA	NA	(Blattner <i>et al.</i> 1997)
ECL1001 (formerly 86-1390)	EPEC isolated from a pig	O45:H-	β	The <i>E. coli</i> Laboratory (EcL) (Hélie <i>et al.</i> 1991)
ECL1001 Nal ^r	Nal ^r variant of strain ECL1001	O45:H-	β	EcL, this study
ECL1019 (formerly 86-4225)	EPEC isolated from a dog	O49:H10	δ	EcL, (Beaudry <i>et al.</i> 1996)
ECL1020	EPEC isolated from a bovine	O45	ε	EcL, this study
E2348/69	Prototypic EPEC isolated from a human	O127:H6	α	(Levine <i>et al.</i> 1985)
STJ348	STEC isolated from a human	O157:H7	γ	Ste-Justine's hospital for Children, Montreal, this study
85-170	Derivative of STEC 84-289, isolated from a human, lacking the genes for Stx toxins	O157:H7	γ	(Tzipori <i>et al.</i> 1987)

*NA, not applicable.

Table II. Primers and PCR products.

Genes	Sequence of primers 5'-3' ^(a)	Amplicon size (bp)	Molecular weight (kDa) of hybrids proteins	Reference
<i>eae</i>	F- <u>GGATCCA</u> ATGGTGAAAAT R- <u>AAGCTT</u> TTTTTACACAAACAGG	2712	95	This study
<i>espA</i>	F- <u>GGATCC</u> ATGGATACATCAACTGCA R- <u>CTCGAGT</u> TTTACCAAGGGATA	585	24	This study
<i>espB</i>	F- <u>GGATCC</u> ATGAATACTATTGATTAT R- <u>CTCGAG</u> ACCAGCTAAGCGAACCGA	954	35	This study
<i>espD</i>	F- <u>GGATCC</u> ATGCTTAATGTAAATAGC R- <u>CTCGAG</u> AACCTCGACCACTAACAAT	1152	43	This study
<i>tir</i>	F- <u>GAGCTC</u> ATGCCTATTGGTAAT R- <u>AAGCTT</u> AACGAAACGTGCGG	1626	80	This study

^(a) Restriction sites are underlined.

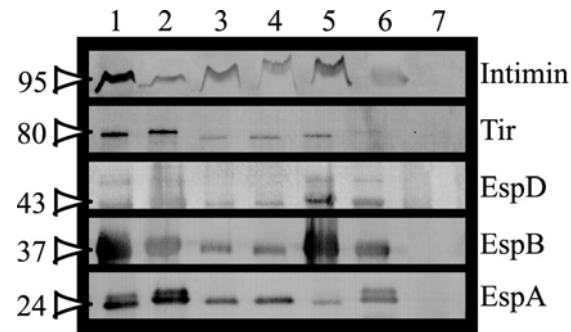


Figure 1. Virulence factor-specific chicken antisera recognize the corresponding protein in both homologous and heterologous AEEC strains on western blot. Lane 1: PEPEC strain ECL1001; lane 2: EPEC strain E2348/69; lanes 3 and 4: STEC_{O157:H7} strains 85-170 and STJ348, respectively; lane 5: bovine EPEC strain ECL1020; and lane 6: dog EPEC strain ECL1019. None of the antisera used in this study reacted with the *E. coli* K-12 control strain MG1655 (Lane 7). Molecular weight markers on the left side are in kDa, whereas specific polyclonal antisera used are on the right side.

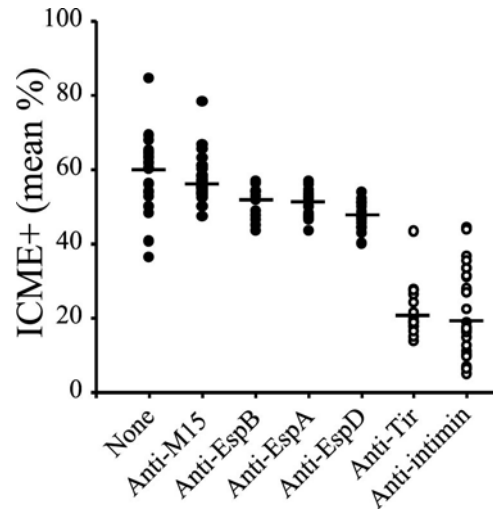


Figure 2. Intimin- and Tir-, but not EspA-, EspB-, and EspD-specific antibodies significantly reduced the mean percentage of ICME showing intimate adherence of homologous PEPEC strain ECL1001 in porcine ileal IVOC. Results, presented as raw data with the horizontal bar as the median, were obtained from quantification of bacterial adherence on HPS-stained sections, and were compared to those for ileal IVOC segments inoculated with strain ECL1001 but with no antibody treatment (None), or following treatment with anti-M15 antibodies (Anti-M15). Open circles (○) are results significantly different from those represented by solid circles (●) ($P < 0.05$).

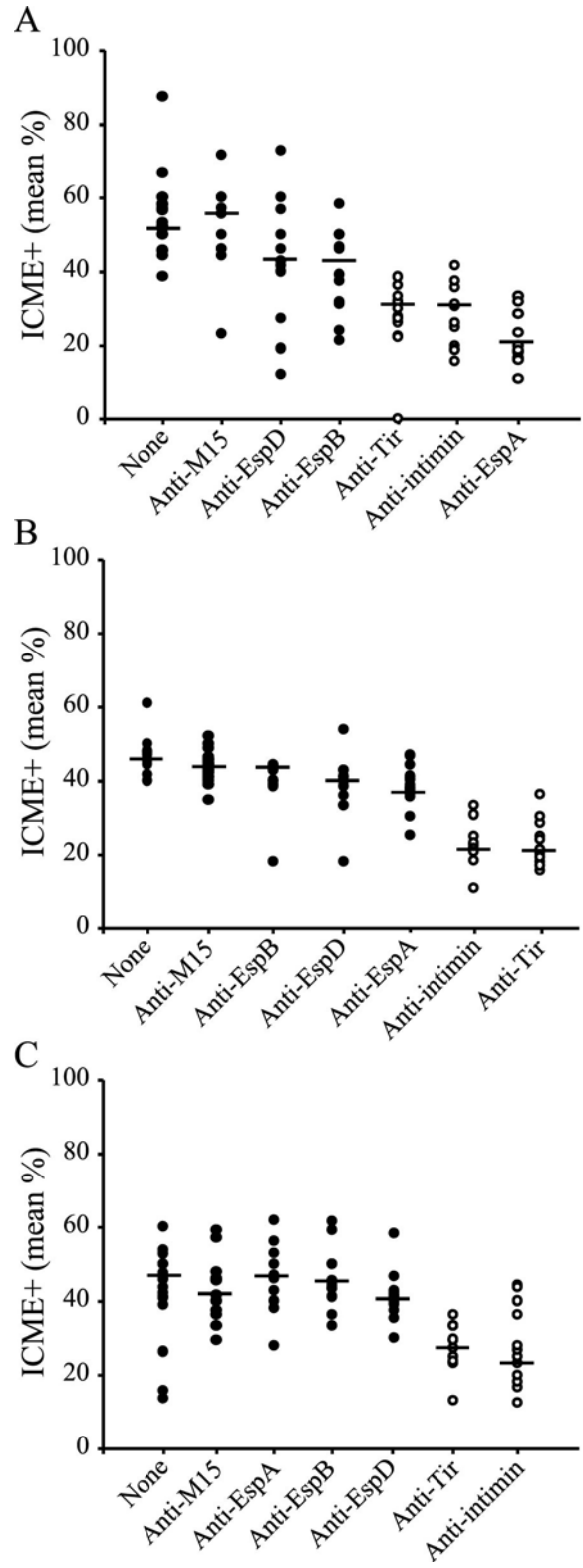


Figure 3. Intimin-, Tir-, and EspA-, but not EspB- or EspD-specific antibodies significantly reduced the mean percentage of ICME showing intimate adherence of

heterologous AEEC strains, in porcine ileal IVOC. (A) Human EPEC strain E2348/69; (B) bovine EPEC strain ECL1020; and (C) dog EPEC strain ECL1019. Results, presented as raw data with the horizontal bar as the median, are obtained from quantification of bacterial adherence on HPS-stained sections, and are compared to percentages for ileal segments inoculated with the strains but with no antibody treatment (None), or following treatment with anti-M15 antibodies (Anti-M15). Open circle results (○) are significantly different from those represented by the solid circles (●)($P < 0.05$).

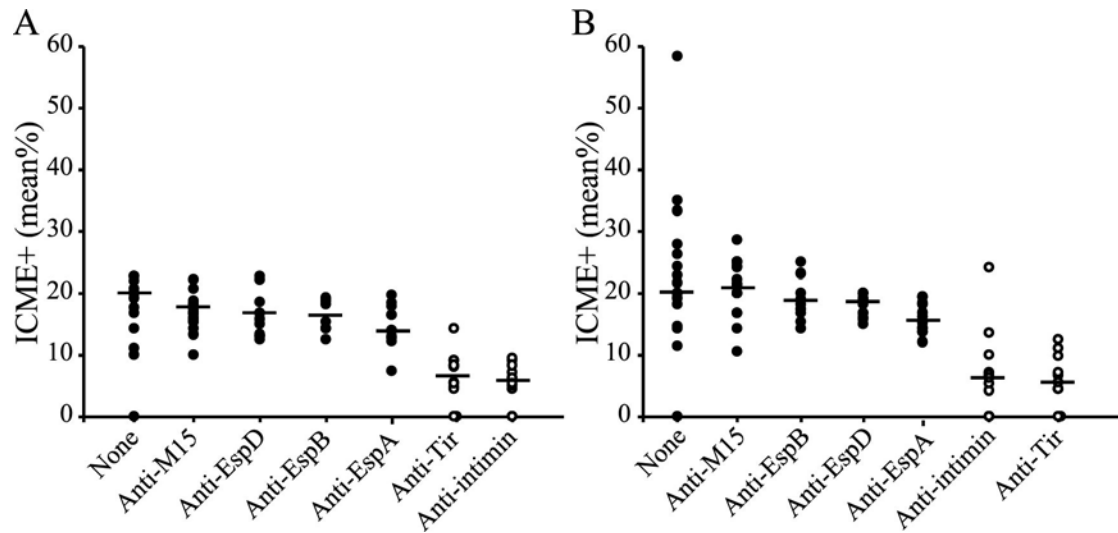


Figure 4. Intimin- and Tir-, but not EspA-, EspB- or EspD-specific antibodies significantly reduced the mean percentage of ICME showing intimate adherence of human STEC_{O157:H7} strains 85-170 (A) and STJ348 (B), in porcine ileal IVOC. Results, presented as raw data with the horizontal bar as the median, are obtained from quantification of bacterial adherence on HPS-stained sections, and are compared to percentages for ileal segments inoculated with strains but with no antibody treatment (None), or following treatment with anti-M15 antibodies (Anti-M15). Open circle results (○) are significantly different from those represented by solid circles (●) ($P < 0.05$).

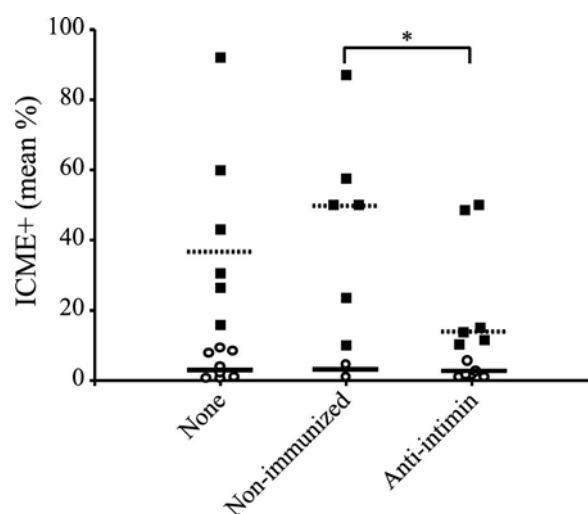


Figure 5. Oral administration of coated spray-dried egg powder containing anti-intimin antibodies (Anti-intimin) resulted in a significantly lower ($P=0.069$) mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium (ICME+) with severe A/E lesions (dashed horizontal bar, ■) as compared to oral administration of coated spray-dried egg powder from non-immunized chickens (Non-immunized) or no treatment (None), in the small intestine of weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 Nal^r. No significant differences were observed between the groups for mean ICME lower than 10% (solid horizontal bar, ○). Results are presented as raw data for A/E-positive pigs with the horizontal bar as the median. $P<0.1$ was taken to be statistically significant.

REFERENCES

- Adegoke, O. A., M. I. McBurney, S. E. Samuels and V. E. Baracos** 2003. Modulation of intestinal protein synthesis and protease mRNA by luminal and systemic nutrients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(6): G1017-26.
- Adu-Bobie, J., L. R. Trabulsi, M. M. Carneiro-Sampaio, G. Dougan and G. Frankel** 1998b. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin alpha and intimin beta from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**(12): 5643-9.
- Akita, E. M. and S. Nakai** 1993b. Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *J Immunol Methods* **162**(2): 155-64.
- An, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels, T. Mabrouk, D. Dugourd, H. Dezfulian and J. Harel** 2000. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb Pathog* **28**(5): 291-300.
- Badea, L., S. Doughty, L. Nicholls, J. Sloan, R. M. Robins-Browne and E. L. Hartland** 2003. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Microb Pathog* **34**(5): 205-15.
- Batisson, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques and J. Harel** 2003. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(8): 4516-25.
- Beaudry, M., C. Zhu, J. M. Fairbrother and J. Harel** 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**(1): 144-8.

Bieber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez and G. K. Schoolnik 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**(5372): 2114-8.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331): 1453-74.

Cleary, J., L. C. Lai, R. K. Shaw, A. Straatman-Iwanowska, M. S. Donnenberg, G. Frankel and S. Knutton 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* **150**(Pt 3): 527-38.

Collington, G. K., I. W. Booth and S. Knutton 1998b. Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection. *Gut* **42**(2): 200-7.

Crawford, J. A. and J. B. Kaper 2002. The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **46**(3): 855-68.

Donnenberg, M. S., J. Yu and J. B. Kaper 1993a. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 4670-80.

Ebina, T., K. Tsukada, K. Umez, M. Nose, K. Tsuda, H. Hatta, M. Kim and T. Yamamoto 1990. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiol Immunol* **34**(7): 617-29.

Feder, I., F. M. Wallace, J. T. Gray, P. Fratamico, P. J. Fedorka-Cray, R. A. Pearce, J. E. Call, R. Perrine and J. B. Luchansky 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerg Infect Dis* **9**(3): 380-3.

Frankel, G., O. Lider, R. Hershkovich, A. P. Mould, S. G. Kachalsky, D. C. Candy, L. Cahalon, M. J. Humphries and G. Dougan 1996. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* **271**(34): 20359-64.

Gonzalez Garcia, E. A. 2002. Animal health and foodborne pathogens: enterohaemorrhagic O157:H7 strains and other pathogenic *Escherichia coli* virotypes (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC). *Pol J Vet Sci* **5**(2): 103-15.

Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith and U. Vecht 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* **62**(1): 75-9.

Hélie, P., M. Morin, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45: K"E65" strain. *Infect Immun* **59**(3): 814-21.

Higgins, R., J., G. Pearson, R. and C. Wray 1997. Attaching and effacing *E. coli*: Microscopic and ultrastructural observations of intestinal infections in pigs. *Adv Exp Med Biol* **412**: 59-62.

Imberechts, H., P. Deprez, E. Van Driessche and P. Pohl 1997. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* **54**: 329-41.

Jarvis, K. G. and J. B. Kaper 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**(11): 4826-9.

Kenny, B., L.-C. Lai, B. B. Finlay and M. S. Donnenberg 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**: 313-23.

Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey and B. B. Finlay 1997b. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**(4): 511-20.

Knutton, S., J. Adu-Bobie, C. Bain, A. D. Phillips, G. Dougan and G. Frankel 1997. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun* **65**(5): 1644-52.

Knutton, S., I. Rosenshine, J. M. Pallen, I. Nisan, C. B. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan and G. Frankel 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* **17**(8): 2166-76.

Kweon, C. H., B. J. Kwon, S. R. Woo, J. M. Kim, G. H. Woo, D. H. Son, W. Hur and Y. S. Lee 2000. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J Vet Med Sci* **62**(9): 961-4.

Lai, L. C., L. A. Wainwright, K. D. Stone and M. S. Donnenberg 1997. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect Immun* **65**(6): 2211-7.

Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements and A. D. O'Brien 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**(3): 550-9.

Li, Y., E. Frey, A. M. Mackenzie and B. B. Finlay 2000. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infect Immun* **68**(9): 5090-5.

Marquardt, R. R., L. Z. Jin, J. W. Kim, L. Fang, A. A. Frohlich and S. K. Baidoo 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early-weaned piglets. *FEMS Immunol Med Microbiol* **23**(4): 283-8.

McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(5): 1664-8.

Nataro, J. P. and J. B. Kaper 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.

Neves, B. C., R. K. Shaw, G. Frankel and S. Knutton 2003. Polymorphisms within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(4): 2262-5.

Newton, H. J., J. Sloan, V. Bennett-Wood, L. M. Adams, R. M. Robins-Browne and E. L. Hartland 2004. Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**(3): 1230-39.

Parissi-Crivelli, A., J. M. Parissi-Crivelli and J. A. Giron 2000. Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. *J Clin Microbiol* **38**(7): 2696-2700.

Piva, A., P. Anfossi, E. Meola, A. Pietri, A. Panciroli, T. Bertuzzi and A. Formigoni 1997. Effect of microcapsulation on absorption processes in the pig. *Livestock Production Science* **51**: 53-61.

Potter, A. A., S. Klashinsky, Y. Li, E. Frey, H. Townsend, D. Rogan, G. Erickson, S. Hinkley, T. Klopfenstein, R. A. Moxley, D. R. Smith and B. B. Finlay 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* **22**(3-4): 362-9.

Sharma, J. M. 1997. The structure and function of the avian immune system. *Acta Vet Hung* **45**(3): 229-38.

Shin, J. H., M. Yang, S. W. Nam, J. T. Kim, N. H. Myung, W. G. Bang and I. H. Roe 2002. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(5): 1061-6.

Sinclair, J. F. and A. D. O'Brien 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem* **277**(4): 2876-85.

Sinclair, J. F. and A. D. O'Brien 2004. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. *J Biol Chem* **279**(32): 33751-8.

Smith, D. J., W. F. King and R. Godiska 2001. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. *Infect Immun* **69**(5): 3135-42.

Stevens, M. P., P. M. van Diemen, G. Frankel, A. D. Phillips and T. S. Wallis 2002. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun* **70**(9): 5158-66.

Stevens, M. P., A. J. Roe, I. Vlisidou, P. M. van Diemen, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, D. L. Gally and T. S. Wallis 2004. Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect Immun* **72**(9): 5402-11.

Tatsuno, I., M. Horie, H. Abe, T. Miki, K. Makino, H. Shinagawa, H. Taguchi, S. Kamiya, T. Hayashi and C. Sasakawa 2001. *toxB* gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* **69**(11): 6660-9.

Tzipori, S., H. Karch, K. I. Wachsmuth, R. M. Robins-Browne, A. D. O'Brien, H. Lior, M. L. Cohen, J. Smithers and M. M. Levine 1987. Role of a 60-megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* **55**(12): 3117-25.

Warawa, J., B. B. Finlay and B. Kenny 1999. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**(10): 5538-40.

Wolff, C., I. Nisan, E. Hanski, G. Frankel and I. Rosenshine 1998. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol **28**(1): 143-55.

www.jefo.ca/jefagro/technology.html 2005.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Donnenberg, M. Beaudry and J. M. Fairbrother 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. Infect Immun **62**(10): 4153-9.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1995b. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. Can J Vet Res **59**(2): 118-23.

Zhu, C., S. Ménard, J. D. Dubreuil and J. M. Fairbrother 1996. Detection and localization of the EaeA protein of attaching and effacing *Escherichia coli* O45 from pigs using a monoclonal antibody. Microbial Pathog **21**: 205-13.

Contribution des auteurs à la réalisation de l'article 3

Francis Girard : a conçu et réalisé toutes les expériences en IVOC et *in vitro* décrites dans l'article 3, à l'exception des fusions génétiques, a développé le modèle *in vivo* utilisé dans cet article, a analysé et interprété les résultats obtenus et a rédigé le manuscrit.

Isabelle Batisson : a réalisé les fusions génétiques, a supervisé la production d'anticorps chez la poule, et a participé à l'écriture et à la correction du manuscrit.

Gabriela Martinez : a supervisé Cynthia Breton dans la préparation des anticorps utilisés *in vivo* et dans la réalisation des expériences *in vivo*, en plus de participer à la rédaction et la correction du manuscrit.

Cynthia Breton : a réalisé les expériences *in vivo* contenues dans ce manuscrit.

Josée Harel : a supervisé les travaux d'Isabelle Batisson, et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

John M. Fairbrother : a supervisé les travaux de Francis Girard, d'Isabelle Batisson, et de Cynthia Breton, et a orienté l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections.

DISCUSSION

L'objectif général de cette étude était d'étudier la pathogenèse des infections à *Escherichia coli* de type attachant et effaçant chez le porc en utilisant la souche entéropathogène porcine (PEPEC) ECL1001 (originellement désignée P86-1390) de sérotype O45:H- (intimine β), de même que plusieurs souches de différents sérotypes et provenant de plusieurs espèces animales, y compris l'humain. L'approche adoptée consistait à étudier plus particulièrement l'adhérence de diverses souches à l'aide d'un modèle d'IVOC utilisant des segments d'iléon provenant de porcelets nouvellement nés, privés de colostrum, et d'étudier le rôle de deux facteurs de virulence des AEEC, soit l'intimine et son récepteur bactérien transloqué Tir, dans le tropisme intestinal et l'adhérence de la souche entéropathogène (EPEC) humaine E2348/69 (O127:H6, intimine α) et ses mutants (intimine-, intimine γ , Tir), de même que pour la STEC_{O157:H7} 85-170, et ses mutants (intimine-, intimine α). Nous avons aussi démontré l'importance du statut immunitaire de l'hôte dans la résistance à la colonisation et au développement des lésions A/E par les PEPEC *in vivo* chez le porc sevré. Grâce au modèle d'infection ainsi développé, nous avons pu caractériser la réponse cytokinaire pro-inflammatoire enclenchée suite à cette infection, et nous avons aussi démontré la présence de l'intimine β et de son récepteur Tir aux sites des lésions A/E *in vivo*. Finalement, nous avons vérifié la capacité d'anticorps spécifiques à certains facteurs de virulence (intimine, EspA, EspB, EspD et Tir) de la souche PEPEC ECL1001 à réduire l'adhérence intime menant au développement des lésions A/E dans un modèle d'IVOC utilisant des segments d'iléon provenant de porcelets nouvellement nés, et *in vivo* (anticorps anti-intimine seulement) dans le modèle porcin préalablement mis au point.

L'adhérence aux cellules épithéliales intestinales (IEC) des *E. coli* attachants et effaçants (AEEC), dont font partie les EPEC et les STEC A/E+, dépend avant tout de divers facteurs impliqués dans l'adhérence initiale (EspA, Bfp), mais aussi de l'interaction entre une protéine de la membrane externe codée par le gène *eae* appelée intimine, et son récepteur bactérien transloqué Tir (Kenny *et al.* 1997b; Deibel *et al.* 1998; Hartland *et al.* 1999). Il existe principalement 5 sous-types d'intimine (α , β , δ , γ et ϵ), établis selon la variation antigénique des 280 acides aminés de leur domaine

C-terminal (Adu-Bobie *et al.* 1998a; Oswald *et al.* 2000). Le sous-type d'intimine influence le tropisme intestinal des EPEC et des STEC A/E+ *ex vivo* dans un modèle IVOC chez l'humain (Fitzhenry *et al.* 2003a), et *in vivo* chez le porcelet axénique (Tzipori *et al.* 1995), en plus d'être responsable d'une spécificité d'hôte, du moins entre l'humain et la souris (Hartland *et al.* 2000). Ces deux caractéristiques sont indépendante de la présence ou du type (EPEC ou STEC) de Tir, suggérant l'existence d'un récepteur de l'hôte pour l'intimine (HIR) (Frankel *et al.* 1994; McKee et O'Brien 1996; An *et al.* 1997; Hartland *et al.* 1999; Deibel *et al.* 2001).

Les données présentées dans cette thèse ont démontré que le modèle d'IVOC de segments iléaux provenant de porcelets nouvellement nés privés de colostrum constitue un modèle d'étude quantifiable et fiable afin d'étudier le phénotype A/E, non seulement de souches PEPEC (Zhu *et al.* 1995b), mais aussi de différentes souches EPEC et STEC A/E+ provenant de diverses espèces animales, incluant le lapin, le chien, le bovin et l'humain. Nos résultats ont démontré que les souches STEC_{O157:H7} adhèrent de façon réduite aux IEC, mais induisent tout de même des lésions A/E. Afin de voir si cette réduction significative de l'adhérence est principalement due à la présence de l'intimine γ , sous-type présent chez les STEC_{O157:H7}, nous avons utilisé des mutants isogéniques intimine- des souches E2348/69 (intimine α , EPEC_{O127:H6}) et 85-170 (intimine γ , STEC_{O157:H7}), complémentés avec une intimine α (dans le cas de 85-170) ou γ (dans le cas de la souche E2348/69) et nous avons étudié leur phénotype en IVOC chez le porc. Ainsi, nous avons démontré que le sous-type d'intimine influence non seulement la quantité de bactéries adhérant aux IEC, mais aussi le tropisme intestinal. L'intimine α favorise l'adhérence bactérienne au niveau du duodénum, du jéjunum et de l'iléon, alors que l'adhérence intime des souches exprimant l'intimine γ est associée presque exclusivement à l'iléon, endroit où l'on retrouve normalement les plaques de Peyer's. Ces données confirment celles obtenues lors d'études réalisées à l'aide d'un modèle d'IVOC chez l'humain (Fitzhenry *et al.* 2003a), et confirment que le tropisme intestinal associée au sous-type d'intimine des EPEC et des STEC_{O157:H7} est Tir-indépendant, puisqu'en aucun temps le Tir original n'a été changé.

Les résultats obtenus concernant le rôle Tir-indépendant du sous-type d'intimine et le tropisme intestinal viennent renforcer l'hypothèse d'un récepteur de l'hôte pour l'intimine (HIR). Dans le but d'accumuler des évidences suggérant la présence d'un récepteur HIR chez le porc, nous avons utilisé un mutant isogénique Δtir et un mutant isogénique Δeae , provenant tous les deux de la souche humaine E2348/69, laquelle adhère très bien à la muqueuse intestinale dans le modèle d'IVOC chez le porc, et nous avons vérifié leur comportement dans ce même modèle. Ainsi, nous avons démontré une adhérence résiduelle relativement importante (<15%) aux IEC, en particulier au niveau du jéjunum et de l'iléon, en comparaison avec le mutant isogénique Δeae (5%). De plus, l'analyse par microscopie électronique, tant à transmission qu'à balayage, a démontrée que le mutant Δtir adhère de façon presque intime aux IEC, induit l'effacement des microvillosités avoisinant les site d'adhérence, mais n'induit pas de réorganisation du cytosquelette et de structure en piédestal, comme c'est le cas pour la souche sauvage dans ce même modèle. Finalement, ces caractéristiques ne furent pas observées pour le mutant Δeae , appuyant l'hypothèse de l'implication de l'intimine dans le phénotype Tir-indépendant observé. Des observations similaires utilisant les mêmes souches et mutants ont été rapportées dans un modèle IVOC utilisant la muqueuse intestinale de jeunes enfants (Shaw *et al.* 2005). L'analyse microscopique combinant la microscopie à transmission et celle à balayage réalisée dans cette thèse nous a permis de mieux démontrer le caractère « quasi-intime » de la relation bactérie-IEC. Nous avons également appuyé l'hypothèse de l'implication de l'intimine dans ce phénotype particulier par la réduction significative de l'adhérence résiduelle du mutant Δtir suite à l'emploi d'anticorps anti-intimine. Mis ensemble, ces données constituent une démonstration solide en IVOC d'au moins un autre récepteur pour l'intimine α de la souche EPEC humaine E2348/69. À la lumière des résultats obtenus en IVOC humain par Shaw *et al.* et de ceux obtenus dans notre étude, il est très probable que ce récepteur soit présent, à la fois chez le porcelet nouvellement né et chez les jeunes enfants. Il est tout de même possible que ce récepteur soit aussi différent entre les espèces, suggérant alors une polyspécificité de l'intimine α . Par contre, il semble que l'on ne voit pas cette compatibilité entre l'humain et la souris. *Citrobacter rodentium*

est l'agent causal de l'hyperplasie cœlonique transmissible murine, une maladie à incidence naturelle chez les souris de laboratoire, caractérisée par une prolifération anormale des cellules épithéliales de la muqueuse du cœlon descendant (Luperchio et Schauer 2001). Il a été démontré qu'une souche de *C. rodentium* exprimant normalement l'intimine β , mais modifiée pour produire l'intimine γ d'une souche STEC A/E+, s'est avérée incapable de coloniser l'intestin de la souris (Hartland *et al.* 2000). Ces données peuvent être expliquées de deux façons: soit la liaison intimine-Tir est l'unique événement amenant l'adhérence intime de *C. rodentium* chez la souris et que cette interaction est dépendante du sous-type d'intimine, soit les récepteurs HIR des EPEC et des STEC_{O157:H7} ne sont pas les mêmes, ou sont simplement absents du tractus gastro-intestinal des souris. Il est aussi possible que l'âge de l'animal influence l'expression de ce HIR. En effet, les données de Shaw *et al.* et celles contenues dans cette thèse sont obtenues à partir d'enfants en bas âge, ou de porcelets nouvellement nés, respectivement, alors que des souris adultes ont été utilisées dans l'étude de Hartland *et al.* Malgré tout, ceci demeure des hypothèses qui devront être investiguées afin de mieux comprendre le rôle de ce HIR.

L'identité de ce HIR n'est toujours pas connue. Divers candidats ont été proposés, en particulier les intégrines $\beta 1$ pour l'intimine α de la souche EPEC humaine E2348/69 (Frankel *et al.* 1996), et la nucléoline pour les intimes α , β et γ (Sinclair et O'Brien 2002; Sinclair et O'Brien 2004). La nucléoline est une protéine impliquée dans la régulation de la croissance cellulaire et la biosynthèse des ribosomes (Ginisty *et al.* 1999). Celle-ci est surtout associée au noyau mais elle est aussi retrouvée à la surface de la cellule, servant de récepteur à plusieurs virus (Orrick *et al.* 1973; de Verdugo *et al.* 1995; Sorokina et Kleinman 1999). Les intégrines $\beta 1$ représentent une famille de glycoprotéines hétérodimériques transmembranaires ayant la capacité de transmettre des signaux à travers la membrane plasmique suite à une interaction avec divers ligands extracellulaires. Les IEC humains ne possèdent pas d'intégrines $\beta 1$ mais les cellules M retrouvées au niveau de l'épithélium en dôme recouvrant les plaques de Peyer expriment des intégrines $\beta 1$ à leur surface, tout comme chez la souris (Clark *et al.* 1998). Ces cellules étant ciblées par l'invasine de

Yersinia pseudotuberculosis (Clark *et al.* 1998), une protéine servant à l'invasion des cellules par la bactérie et partageant des similitudes importantes au niveau du site de liaison avec l'intimine des AEEC, il est donc possible qu'il y ait interaction entre l'intimine des EPEC et les cellules M de l'épithélium recouvrant les plaques de Peyer (Kelly *et al.* 1999). Comme l'adhérence résiduelle observée lors de l'infection des IVOC porcins à l'aide du mutant E2348/69 Δ *tir* était légèrement plus importante au niveau du jéjunum et de l'iléon qu'au niveau du duodénum, et que les plaques de Peyer sont surtout retrouvées au niveau du jéjunum et de l'iléon chez le porc (Bianchi et van der Heijden 1994; Stokes *et al.* 1994), il est possible que ce récepteur, du moins chez le porc, corresponde aux intégrines β 1. Néanmoins, d'autres expériences seront nécessaires afin de confirmer ou infirmer cette possibilité.

Le modèle IVOC optimisé dans cette thèse nous a également permis de caractériser le rôle du nouveau facteur Paa dans l'adhérence de la souche PEPEC ECL1001 et de la souche de lapin E22 (voir Annexes, Article 4). Ainsi, nous avons démontré qu'une mutation du gène *paa* réduit l'adhérence de la souche PEPEC ECL1001 et de la souche de lapin E22 (O103:H2). Dans le but de confirmer l'implication du facteur Paa dans le processus menant aux lésions A/E, nous avons utilisé des anticorps IgY anti-Paa afin de bloquer son action *ex vivo*. Les résultats obtenus nous démontrent que la protéine est exprimée à la surface de la bactérie durant le processus lésionnel, la rendant accessible aux IgY anti-Paa. Considérant le rôle de Paa dans l'adhérence des AEEC, de même que sa localisation à la surface de la bactérie, il est envisageable de considérer Paa comme une cible vaccinale potentielle. En effet, *paa* est retrouvé non seulement chez les PEPEC, mais aussi chez les STEC_{O157:H7} et chez les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) (An *et al.* 1999a).

Les AEEC sont associés à des cas naturels de lésions A/E chez le porc sevré (Janke *et al.* 1989). Néanmoins, leur présence chez des porcs, tant sains que malades, suggère que les infections naturelles à PEPEC seraient opportunistes. Les souches PEPEC identifiées sont souvent de sérotype O45 (Hélie *et al.* 1991) et sont capables d'induire, *in vitro*, en IVOC (Zhu *et al.* 1995b) et *in vivo*, la formation de lésions A/E similaires à celles retrouvées dans des cas d'infections naturelles à EPEC chez

l'humain (Law 1994; Zhu *et al.* 1994). La capacité des PEPEC de sérotype O45 à causer des lésions A/E est associée à la présence du gène *eae* codant pour l'intimine (Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b; Zhu *et al.* 1996). Néanmoins, malgré le fait que les lésions A/E aient pu être reproduites expérimentalement chez le porcelet nouvellement-né infecté par des PEPEC (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1995b), ou des STEC_{O157:H7} (Tzipori *et al.* 1987; Donnenberg *et al.* 1993b; Dean-Nystrom *et al.* 2000), l'induction expérimentale de telles lésions chez le porc sevré s'est avérée infructueuse jusqu'à maintenant. Parmi les nombreuses différences physiologiques entre les porcelets nouvellement nés et le porc sevré figure, entre autre, la présence d'un système immunitaire mature et fonctionnel.

Nous avons voulu vérifier l'implication du statut immunitaire de l'hôte, ici le porc sevré à 17 jours, dans la résistance à la colonisation et au développement des lésions A/E *in vivo* suivant une infection expérimentale avec la souche PEPEC ECL1001. Des résultats préliminaires obtenus dans notre laboratoire ont permis de démontrer que l'inoculation d'un variant résistant à l'acide nalidixique (Nal^r) de la souche PEPEC ECL1001 à des porcs sevrés à 17 jours d'âges, de même que l'inoculation de porcs sevrés à l'aide d'une combinaison de deux souches PEPEC Nal^r, ne résulte qu'en une très faible prévalence de lésions A/E au niveau du caecum et du côlon, et les lésions présentes sont d'une sévérité négligeable. Nous avons donc envisagé de répéter l'expérience mais cette fois, chez des porcs provenant d'un élevage où sévit une épisode d'infection due au virus du Syndrome respiratoire et reproducteur porcin (SRRPV), lequel est connu pour diminuer l'efficacité du système immunitaire des porcs infectés (Feng *et al.* 2001).

Le SRRPV est un petit virus à ARN enveloppé de la famille des *Arteriviridae* se répliquant principalement dans les macrophages, et causant une immunosuppression des porcs infectés, se traduisant par une augmentation de la susceptibilité à diverses infections bactériennes secondaires, entre autre *Streptococcus suis* (Galina *et al.* 1994) et *Salmonella choleraesuis* (Wills *et al.* 2000). Le génome du SRRPV contient 8 cadres de lecture ouverts (ORFs), et l'ORF 5 code pour différentes protéines potentiellement impliquées dans l'apoptose des thymocytes *in vivo* (Feng *et*

al. 2001). En considérant le potentiel immunosuppresseur du SRRPV, nous avons donc envisagés d'inoculer expérimentalement des porcs sevrés provenant d'un élevage où sévissait une épisode d'infection due au SRRPV avec un mélange de deux souches PEPEC NaI^r, afin de voir si une synergie entre plusieurs souches PEPEC favorisait le développement des lésions A/E *in vivo* chez le porc sevré. Nous avons ainsi démontré que la prévalence des lésions A/E, tant au niveau du caecum que du côlon, était significativement plus élevée chez les porcs SRRPV+ que chez les porcs SRRPV- (voir Annexe, résultats complémentaires article 2). Dans le but de mieux contrôler les différents paramètres expérimentaux, nous avons voulu trouver un immunosuppresseur capable de mimer les effets du SRRPV sur le système immunitaire. En effet, l'utilisation d'une coinfection PEPEC-SRRPV ne s'avérait qu'une solution de dernier recours, puisque le taux de mortalité néonatale et *in utero* suite à l'inoculation du virus chez la truie, de même que sa transmission aux porcelets sont élevés (Cheon et Chae 2001).

La dexaméthasone est un glucocorticoïde de synthèse à longue durée d'action agissant sur le système immunitaire d'une façon semblable aux protéines de l'ORF 5 de SRRPV. Principalement, la dexaméthasone réduit l'efficacité de la réponse immunitaire innée et inhibe la production de médiateurs pro-inflammatoires, tels les cytokines et certaines chémokines par la suppression de la réponse « T helper » (Tsitoura et Rothman 2004) et l'apoptose des leucocytes (Chen *et al.* 2004). Elle est également utilisée comme agent anti-inflammatoire, amenant une diminution de l'accumulation de leucocytes circulants dans plusieurs modèles animaux (Allcock *et al.* 2001), l'inhibition du relargage de la lactoferrine, protéine impliquée dans la dégranulation des neutrophiles (Schmaldienst et Horl 1996), et la réduction de la production d'interleukine (IL-) 8, impliquée dans le recrutement de cellules pro-inflammatoires, en particulier les neutrophiles (van Woensel *et al.* 2003).

Nous avons donc repris nos expériences *in vivo* en utilisant cette fois-ci qu'une seule souche PEPEC (variant NaI^r de la souche ECL1001 O45:H-, étant la souche PEPEC la mieux caractérisée dans notre laboratoire), mais en conservant le même design expérimental qu'auparavant, *i.e.* des porcs sevrés à 17 jours, infectés 4

jours consécutifs à partir de 23 jours d'âge, et euthanasiés et nécropsiés à 27 jours d'âge. Nos résultats ont démontré que l'administration orale de dexaméthasone à une concentration de 3 mg/kg pendant 7 jours consécutifs (3 jours précédant la première infection expérimentale et durant toute la durée de l'infection expérimentale) augmente significativement la colonisation bactérienne (O45+) et la prévalence de lésions A/E au niveau de l'iléon, du caecum et du côlon. Ces données nous indiquent que le statut immunitaire du porc influence la résistance à la colonisation et au développement des lésions A/E, renforçant l'hypothèse d'une infection à caractère opportuniste.

Les résultats obtenus suite à l'administration orale de dexaméthasone, de même que son mode d'action, suggèrent une action sur le système immunitaire du porc, facilitant le développement des lésions A/E *in vivo* dans notre modèle expérimental. Une meilleure compréhension des différents mécanismes modulés par la dexaméthasone nous permettrait de mieux comprendre l'implication du système immunitaire de l'hôte, en particulier celle des cytokines et chémokines pro-inflammatoires, dans la résistance à la colonisation et au développement des lésions A/E chez le porc sevré. Il est maintenant bien établi que les cytokines peuvent jouer un rôle tant protecteur que néfaste dans la pathogenèse de divers pathogènes du tractus gastro-intestinal. Ainsi, la synthèse et la sécrétion d'IL-8 au site d'infection jouerait un rôle dans le processus inflammatoire et la destruction des cellules épithéliales intestinales chez les EPEC et de *Shigella flexneri*, *in vitro* et *in vivo* respectivement (Mavris et Sansonetti 2004), alors que chez *Helicobacter pylori*, la réponse immunitaire (IL-8, β défensines) jouerait un double rôle, d'une part en protégeant l'hôte contre l'infection au début, puis en favorisant la détérioration des sites d'infections par la suite (Hamanaka *et al.* 2001; Naka *et al.* 2001). Il était donc d'intérêt de caractériser la réponse pro-inflammatoire engendrée suite à une infection à PEPEC *in vivo* chez le porc sevré.

Afin de répondre à cet objectif, nous avons vérifié la production d'ARN messagers (ARNm) correspondant à différentes cytokines et chémokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p40, TNF- α , iNOS) par RT-PCR au niveau

de l'iléon (en présence ou en absence de plaques de Peyer) et du côlon. Nos résultats nous indiquent un patron de synthèse de cytokines différent d'un organe à l'autre, et même d'une structure à l'autre. Puisqu'une très faible prévalence de lésions A/E fut retrouvée chez les porcs infectés mais non traité à la dexaméthasone, il semble donc que la réponse pro-inflammatoire induite suite à l'infection de porcs sevrés par le variant Nal^r de la souche PEPEC ECL1001, caractérisée par l'augmentation de l'IL-6, l'IL-8, l'IL-1 β et l'IL-12p40, joueraient, à ce stade, un rôle dans la résistance de l'hôte face à la colonisation et au développement des lésions A/E chez le porc sevré. Cette hypothèse est appuyée par l'absence de synthèse significativement plus élevée d'ARNm correspondant à l'IL6, l'IL-8, l'IL-1 β et l'IL-12p40 chez les porcs ayant reçu de la dexaméthasone et ce, malgré une infection expérimentale et une forte prévalence de lésions A/E. Ces résultats constituent, selon nous, la première étude ayant caractérisée la réponse inflammatoire associée à un AEEC *in vivo*.

Il est maintenant connu que la dexaméthasone diminue l'activation des lymphocytes T, principalement en inhibant la synthèse d'IL-2, d'IL-4, d'IL-6 (Brunetti *et al.* 2002), d'IFN- γ (Hu *et al.* 2003), de TNF- α (Dziedzic *et al.* 2003) et d'IL-12p40 en culture de monocytes humains (Ma *et al.* 2004), en inhibant différents facteurs de transcription, en particulier la protéine activatrice-1 (AP-1), le NF-AT, la voie des STATs, et le facteur NK- $\kappa\beta$ (Adcock 2001). Notre étude suggère donc la capacité de la dexaméthasone à inhiber, du moins en partie, la synthèse d'ARNm correspondant à l'IL-1 β , l'IL-6, l'IL-8 et l'IL-12p40 par le tractus gastro-intestinal du porc sevré. La littérature rapporte qu'*in vitro*, les premières étapes d'une infection expérimentale à EPEC ou à STEC A/E+ augmente de façon significative la synthèse du NK- $\kappa\beta$ et de IL-8 (Savkovic *et al.* 1997; Hecht *et al.* 1999), alors qu'une infection prolongée à STEC A/E+ amène la diminution de la synthèse du NK- $\kappa\beta$, de l'IL-6 et de l'IL-8 et ce, d'une manière EspB-dépendante (Hauf et Chakraborty 2003). EspB, une protéine sécrétée par le système de sécrétion de type III des AEEC et de *C. rodentium*, est directement impliquée dans l'accumulation d'actine cellulaire sous le site d'attachement des EPEC sur la cellule hôte (Taylor *et al.* 1999) et est requise afin de permettre l'association de Tir à la membrane cellulaire de l'hôte (Kenny *et al.*

1997b). L'utilisation de mutant $\Delta espB$ chez l'humain a aussi démontré que la présence de cette protéine est directement reliée à l'élaboration d'une réponse humorale et lymphoproliférative (Tacket *et al.* 2000). Ici, il est possible que l'augmentation de la synthèse d'ARNm correspondant à l'IL-6 et l'IL-8 observée chez les porcs infectés mais non traités à la dexaméthasone soit due, en partie, à la faible prévalence de lésions A/E et, du même coup, à la faible translocation du facteur EspB dans le cytoplasme de la cellule hôte.

Les données contenues dans cette étude suggèrent également que différentes structures et/ou cellules du système immunitaire gastro-intestinal (GALT) seraient impliquées dans la synthèse de cytokines pro-inflammatoires en vue de protéger l'hôte face à une infection à PEPEC *in vivo*. À cet effet, des études *in vivo* réalisées chez des souris knock-out à l'aide du pathogène murin *C. rodentium* ont démontré que l'absence de lymphocytes B et T favorise la persistance de l'inflammation associée à la présence de lésions A/E (Vallance *et al.* 2002a). Néanmoins, l'initiation d'une telle réponse nécessiterait l'implication des cellules épithéliales intestinales (IEC), lesquelles sont les premières cellules du tractus gastro-intestinal à interagir avec les pathogènes (Vallance *et al.* 2003). Les IEC agissent comme « chien de garde » pour le système immunitaire gastro-intestinal (Eckmann *et al.* 1995; Neish 2002), et la littérature regorge d'évidences, tant *in vitro* qu'*in vivo*, de la synthèse de cytokines pro-inflammatoires, en particulier l'IL-1 α et β et l'IL-6, par les IEC de différentes espèces animales (Stadnyk *et al.* 1995; Rogler et Andus 1998; Pritts *et al.* 2002). En plus des IEC, différentes cellules participent à la surveillance immunitaire de la muqueuse du tractus gastro-intestinal, incluant les cellules dendritiques, retrouvées principalement au niveau des plaques de Peyer, des nœuds lymphatiques mésentériques, des follicules lymphoïdes isolés, de la lamina propria et possiblement de l'épithélium (Stagg *et al.* 2003), les lymphocytes intra-épithéliaux et ceux retrouvés dans les plaques de Peyer, les cellules M (Spahn et Kucharzik 2004), et les monocytes/macrophages (Ma *et al.* 2003). Pour l'instant, il nous est difficile de préciser les types de cellules impliquées dans la production de l'une ou l'autre des

cytokines modulées suite à une infection à PEPEC *in vivo*. Néanmoins, la littérature nous permet d'émettre des hypothèses.

Ainsi, en présence de plaques de Peyer, l'IL-6 pourrait être synthétisée par les cellules épithéliales des dômes ou par les macrophages, pour ensuite être directement dirigée vers les lymphocytes B différenciés. L'IL-6 est une cytokine multifonctionnelle impliquée principalement dans la synthèse d'IgA sécrétoires par les lymphocytes B différenciés en présence de cellules dendritiques, de même que dans l'initiation d'une réponse de phase aiguë locale via la synthèse de protéine C réactive (Hedges *et al.* 1995; MacDonald et Monteleone 2001). Cette cytokine est aussi requise afin d'assurer une protection contre les *E. coli* systémiques chez la souris (Dalrymple *et al.* 1996). L'augmentation des IgA sériques ou sécrétoires suite à une infection à EPEC (Levine *et al.* 1985; Bhogal *et al.* 1987; Parissi-Crivelli *et al.* 2000; de Souza Campos Fernandes *et al.* 2002), à STEC A/E + (Karpman *et al.* 2002; Tsutsumi *et al.* 2004), ou à *C. rodentium* (Simmons *et al.* 2002; Simmons *et al.* 2003; Maaser *et al.* 2004) est bien documentée, bien qu'il semble que celle-ci ne soit pas responsable de l'élimination de l'infection, du moins chez la souris (Maaser *et al.* 2004). Il est donc possible que l'augmentation de la synthèse d'IL-6 suite à notre infection expérimentale à PEPEC mène à une augmentation de la synthèse et la sécrétion d'IgA sécrétoires. Néanmoins, cette hypothèse demeure à être démontrée.

Pour sa part, l'augmentation de la synthèse d'ARNm correspondant à l'IL-8 observée dans notre étude pourrait provenir des cellules épithéliales des dômes, ou des macrophages et/ou fibroblastes de la lamina propria. L'IL-8 ainsi produite pourrait initier le recrutement local de neutrophiles (Rogler et Andus 1998), bien qu'un nombre peu élevé de neutrophiles n'ait été observé dans notre étude. L'augmentation de la synthèse d'ARNm correspondant à l'IL-1 β et l'IL-12p40 au niveau de l'iléon en absence de plaques de Peyer pourrait, quant à elle, provenir des macrophages et/ou des cellules épithéliales. *In vivo*, l'augmentation d'IL-1 β et d'IL-12p40 pourrait orienter la réponse Th1 et Th2, respectivement. Des résultats préliminaires obtenus suite à des marquages immunohistochimiques sur des coupes intestinales provenant de porcs infectés dans cette étude laissent croire que les

cellules épithéliales seraient la principale source d'IL-12p40 (données non-présentées).

Du point de vue bactérien, des marquages immunofluorescents réalisés sur des coupes intestinales provenant des porcs avec lésions A/E ont permis de démontrer la présence de l'intimine et de son récepteur Tir sur le site des lésions A/E. Ainsi, nous avons fréquemment observé les deux protéines de façon colocalisée, de même que l'intimine seule, à la surface de bactéries intimement adhérees aux IEC. Cette démonstration confirme que l'intimine et son récepteur bactérien Tir sont produits *in vivo*, suggérant fortement leur implication dans le développement des lésions A/E par les PEPEC *in vivo*, confirmant du même coup les observations *in vitro* et *in vivo* réalisées précédemment (Donnenberg *et al.* 1993b; Kenny *et al.* 1997b; Marches *et al.* 2000; Shaw *et al.* 2002; Deng *et al.* 2003).

Les résultats obtenus dans le modèle IVOC porcin ont démontré l'importance de divers facteurs de virulence des AEEC dans le processus lésionnel menant à l'adhérence intime des bactéries et au développement des lésions A/E, en particulier l'intimine et son récepteur Tir. L'importance de ces divers facteurs de virulence dans la réponse de l'hôte a aussi été démontrée lors d'infections naturelles à AEEC chez l'humain. En effet, il est possible de retrouver, dans le sérum et le colostrum, des anticorps dirigés contre certains facteurs de virulence, en particulier l'intimine, les protéines sécrétées EspA et EspB (Parissi-Crivelli *et al.* 2000), et le récepteur Tir (Li *et al.* 2000). Ceci confirme donc la reconnaissance de ces facteurs par le système immunitaire de l'hôte, et suggère leur considération lors de l'élaboration de stratégies prophylactiques et thérapeutiques contre les AEEC.

Les résultats contenus dans cette thèse suggèrent que l'utilisation d'anticorps IgY dirigés contre divers facteurs de virulence des AEEC s'avère une méthode prometteuse afin de réduire la sévérité et l'étendue des lésions A/E, tant *ex vivo* qu'*in vivo* chez le porc. En effet, nous avons démontré que l'utilisation d'IgY spécifiques à l'intimine et au récepteur Tir de la souche PEPEC ECL1001 s'avère capable de réduire significativement l'adhérence intime menant au développement des lésions

A/E en IVOC intestinaux porcins et ce, tant dans un système homologue (souche PEPEC ECL1001), qu'hétérologue (souches EPEC humaines, bovins et canines, et STEC_{O157:H7}).

Les anticorps anti-intimine se sont avérés efficaces à réduire l'adhérence intime de 6 souches EPEC et STEC A/E+, possédant des sous-types d'intimine différents (α , β , γ , δ et ε). La capacité de tels anticorps à inhiber l'adhérence des STEC A/E+ possédant l'intimine γ s'avère d'une importance capitale puisque les STEC A/E+ constituent une source importante de toxi-infections alimentaires chez l'humain (Nataro et Kaper 1998). Il est maintenant connu que les bovins constituent un réservoir important de STEC A/E+ de sérotypes O26, O111 et O157, pour ne nommer que ceux là (Gonzalez Garcia 2002). La présence de STEC_{O157:H7} a aussi été démontrée chez le porc (Feder *et al.* 2003), augmentant ainsi les sources de contamination pour les humains. Puisque nos anticorps IgY anti-intimine se sont avérés capables de réduire l'adhérence intime des deux souches STEC_{O157:H7}, il est réaliste d'envisager l'utilisation de tels anticorps afin de réduire la colonisation et ainsi, l'excrétion de STEC A/E+ possédant l'intimine γ chez le bovin et le porc, réduisant du même coup les risques de toxi-infections alimentaires chez l'humain. La capacité de ces anticorps à réduire l'adhérence intime de la souche EPEC humaine E2348/69 (O127:H6, intimine α) constitue également un élément intéressant puisque les EPEC sont responsables d'un fort pourcentage de la mortalité infantile mondiale (Nataro et Kaper 1998). Les données contenues dans cette thèse, de même que celles présentées par Shaw *et al.* (Shaw *et al.* 2005) ont démontré que l'intimine interagit non seulement avec son récepteur Tir, mais aussi avec un autre récepteur, potentiellement eucaryote. Il est donc possible que l'utilisation d'anticorps anti-intimine réduise efficacement l'adhérence intime à un stade précoce, i.e. avant l'interaction de l'intimine et de son récepteur Tir menant au développement des lésions A/E, limitant ainsi les effets pathologiques dus au développement proprement dit des lésions A/E. Les anticorps anti-Tir, quant à eux, se sont avérés efficaces à réduire le pourcentage d'adhérence intime chez toutes les souches utilisées dans cette étude, tant EPEC que STEC A/E+, à un niveau similaire à celui retrouvé lors de

l'utilisation des anticorps anti-intimine. Ces résultats apportent une évidence supplémentaire quant à l'implication de l'intimine et de son récepteur bactérien Tir dans le processus lésionnel des AEEC.

À notre grande surprise, les anticorps anti-EspA se sont avérés efficaces à réduire l'adhérence intime de la souche EPEC humaine E2348/69. La protéine EspA, principal constituant du filament EspA à la surface des EPEC et des STEC A/E+, apparaît lors de la formation des lésions A/E, forme un lien direct entre la bactérie et la cellule hôte et est requis pour la translocation de EspB et Tir vers la cellule hôte (Knutton *et al.* 1998; Neves *et al.* 1998). *In vitro*, ce filament n'est exprimé qu'au début de la formation des lésions A/E et semble disparaître complètement lors du début de l'adhérence intime avec la cellule épithéliale (Knutton *et al.* 1998). Les résultats obtenus démontrent que le filament EspA est une cible à considérer dans le but d'élaborer un vaccin contre les souches EPEC (Neves *et al.* 1998). Leur efficacité limitée à la souche EPEC humaine peut être attribuable à l'hétérogénéité existant entre la protéine EspA des EPEC et celle des STEC A/E+. En effet, une étude récente a démontré qu'un antiserum dirigé contre la protéine EspA de la souche EPEC humaine E2348/69 ne reconnaît pas la protéine EspA d'une souche STEC A/E+ et vice et versa (Neves *et al.* 2003). Néanmoins, les anticorps anti-EspA obtenus dans cette thèse sont capables de reconnaître la protéine EspA de deux souches STEC_{O157:H7}. Cette reconnaissance inattendue peut s'expliquer par le caractère « atypique » de la souche PEPEC ECL1001, dont les gènes ont été utilisés afin de produire les protéines de fusion nécessaires à l'immunisation des poules. En effet, la souche PEPEC ECL1001 ne possède pas les gènes codant pour les toxines Shiga, tout comme les EPEC, mais elle est *bfp*-, tout comme les STEC A/E+ et les EPEC atypiques (Nataro et Kaper 1998). Il est donc possible que la souche PEPEC ECL1001 possède une protéine EspA « hybride », expliquant la reconnaissance, à la fois de la protéine EspA des EPEC, et de celle des STEC_{O157:H7}. L'absence d'efficacité des anti-EspA contre la souche PEPEC ECL1001, la souche EPEC canine ECL1019, et la souche bovine ECL1020, peut, quant à elle, s'expliquer de diverses façons. Il est possible que le filament EspA n'occupe qu'un rôle accessoire comme adhésine dans l'adhérence de ces souches (Cleary *et al.* 2004), et que l'inhibition de

l'adhérence médiée par EspA soit compensée par l'action d'autres adhésines ou fimbriae, tel le BFP (Cleary *et al.* 2004), Paa (An *et al.* 1999a), Efa1/LifA (Stevens *et al.* 2002; Badea *et al.* 2003), ToxB chez les STEC A/E+ (Tatsuno *et al.* 2001), ou le fimbriae long et polaire (Newton *et al.* 2004). L'inhibition de l'adhérence initiale étant une cible intéressante puisqu'elle constitue une des premières étapes de la pathogenèse des infections à AEEC, il faudra néanmoins considérer l'implication de plusieurs adhésines et/ou fimbriae dans l'élaboration de stratégies vaccinales. Les résultats obtenus en IVOC avec les anticorps IgY anti-intimine, anti-Tir, et anti-EspA constituent en soi une preuve de concept. La prochaine étape logique consistait à vérifier l'efficacité d'anticorps anti-facteurs de virulence à réduire l'étendue et la sévérité des lésions A/E *in vivo* chez le porc.

Les différents résultats obtenus dans cette étude démontrent l'importance de l'intimine dans le développement des lésions A/E, tant en IVOC qu'*in vivo* chez le porc sevré. L'étape subséquente consistait à vérifier le potentiel des anticorps anti-intimine à réduire l'adhérence intime menant aux lésions A/E *in vivo*. Pour ce faire, nous avons vérifié le potentiel protecteur d'une poudre d'œuf entier enrobée (équivalent à 3 g de poudre d'œuf entier par porc par jour) et contenant des anticorps anti-intimine chez le porc sevré. L'utilisation d'un enrobage commercial fait à base d'une matrice d'huiles végétales, devait favoriser le relargage des anticorps anti-intimine à pH neutre (Piva *et al.* 1997), principalement au niveau du petit intestin. Les résultats obtenus démontrent que l'administration d'anticorps anti-intimine à des porcs infectés expérimentalement par un variant NaI^r de la souche PEPEC ECL1001, résulte en une réduction significative de l'étendue des lésions A/E au niveau du petit intestin, lorsque comparé à des porcs ayant reçu de la poudre d'œufs ne contenant pas d'anticorps spécifiques. Ayant démontré que les anticorps IgY anti-intimine n'affectent pas la croissance de la souche PEPEC ECL1001 *in vitro*, nous croyons que la réduction significative de l'étendue des lésions A/E observée au niveau du petit intestin est le résultat d'une liaison des anticorps sur l'intimine, limitant subséquemment sa capacité à interagir avec le récepteur Tir, et/ou tout autre récepteur eucaryote. Bien que nos résultats soient prometteurs, une optimisation de la présentation et/ou de la quantité d'anticorps donnés devra être effectuée sur un plus

grand nombre de porcs afin de confirmer les tendances obtenues. Néanmoins, les résultats présentés dans cette étude constituent la première démonstration, tant en IVOC qu'*in vivo*, du potentiel d'anticorps anti-intimine à réduire l'adhérence intime menant au développement des lésions A/E. Éventuellement, une telle approche pourrait être envisagée afin de réduire les risques d'infections associés aux AEEC, tant chez l'humain que chez d'autres espèces animales, dont le porc.

CONCLUSIONS

L'intimine et son récepteur Tir sont nécessaires au développement de lésions A/E *ex vivo* chez le porc, le sous-type d'intimine, ici α et γ , influence l'adhérence et le tropisme intestinal des EPEC et des STEC_{O157:H7}, favorisant ainsi le petit intestin entier (α), ou l'iléon (γ) et enfin, l'adhérence et le tropisme intestinal de l'intimine sont des mécanismes indépendants de Tir.

Il existe un autre récepteur, probablement eucaryote, pour l'intimine. Chez le porcelet nouveau-né, ce récepteur serait localisé surtout au niveau du jéjunum et de l'iléon. L'intimine est responsable, du moins en partie, de l'adhérence quasi-intime observée en IVOC en absence de Tir. L'identification et la caractérisation de ce nouveau récepteur sont d'une importance capitale afin de mieux comprendre les différentes étapes de la pathogenèse des infections à AEEC et ainsi, élaborer de nouvelles stratégies prophylactiques et thérapeutiques.

Le statut immunitaire du porc sevré influence la résistance globale au développement des lésions A/E *in vivo*. En particulier, la réponse cytokinaire pro-inflammatoire, caractérisée par la production d'IL-1 β , IL-6, IL-8 et IL-12p40, joue un rôle protecteur contre les PEPEC *in vivo* et cette réponse varie selon les sites intestinaux échantillonnés. Différentes cellules et/ou structures sont probablement impliquées dans la réponse pro-inflammatoire modulée suite à une infection à PEPEC *in vivo* chez le porc sevré. L'intimine et son récepteur Tir sont impliqués dans la pathogenèse des infections à PEPEC *in vivo*.

L'utilisation d'anticorps IgY dirigés contre l'intimine et le récepteur Tir s'avère efficace à réduire l'adhérence intime menant au développement des lésions A/E. Les anticorps anti-intimine sont efficace contre les 5 principaux sous-types d'intimine (α , β , γ , δ et ϵ), retrouvées tant chez les EPEC que chez les STEC A/E+. Les anticorps anti-Tir s'avère aussi efficace contre plusieurs souches de divers sérotypes et provenant de diverses origines animales. Ainsi, il est envisageable que l'administration orale de ces anticorps permettra la prévention du développement des lésions A/E *in vivo*. Ceci confirme l'implication que ces divers facteurs de virulence dans la pathogenèse des infections à AEEC en IVOC.

Finalement, l'administration orale d'anticorps anti-intimine produits chez la poule s'avère un moyen prometteur afin de réduire l'adhérence intime d'une souche PEPEC *in vivo*, réduisant du même coup la sévérité des lésions A/E au niveau du petit intestin. Il est probable que ces anticorps, en agissant directement sur l'intimine, réduisent sa capacité à interagir avec Tir, ou tout autre récepteur eucaryote, réduisant du même coup l'adhérence de la souche PEPEC. Ceci ajoute également une évidence indirecte de l'implication de l'intimine dans le processus lésionnel menant au développement des lésions A/E par les PEPEC *in vivo*.

Mis ensemble, les différents résultats, tant fondamentaux qu'appliqués, obtenus lors de cette étude nous permettent de mieux comprendre la complexité du processus multifactoriel menant au développement des lésions A/E par les AEEC et, du même coup, d'élaborer de nouvelles stratégies immunoprophylactiques et thérapeutiques pouvant limiter l'utilisation d'antibiotiques.

BIBLIOGRAPHIE

Abul-Milh, M., Y. Wu, B. Lau, C. A. Lingwood and D. B. Foster 2001. Induction of epithelial cell death including apoptosis by enteropathogenic *Escherichia coli* expressing bundle-forming pili. *Infect Immun* **69**(12): 7356-64.

Adcock, I. M. 2001. Glucocorticoid-regulated transcription factors. *Pulm Pharmacol Ther* **14**(3): 211-9.

Adegoke, O. A., M. I. McBurney, S. E. Samuels and V. E. Baracos 2003. Modulation of intestinal protein synthesis and protease mRNA by luminal and systemic nutrients. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **284**(6): G1017-26.

Adu-Bobie, J., G. Frankel, C. Bain, A. G. Goncalves, L. R. Trabulsi, G. Douce, S. Knutton and G. Dougan 1998a. Detection of intimins alpha, beta, gamma, and delta, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens. *J. Clin. Microbiol.* **36**(3): 662-8.

Adu-Bobie, J., L. R. Trabulsi, M. M. Carneiro-Sampaio, G. Dougan and G. Frankel 1998b. Identification of immunodominant regions within the C-terminal cell binding domain of intimin alpha and intimin beta from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**(12): 5643-9.

Ahmer, B. M., J. van Reeuwijk, C. D. Timmers, P. J. Valentine and F. Heffron 1998. *Salmonella typhimurium* encodes an SdiA homolog, a putative quorum sensor of the LuxR family, that regulates genes on the virulence plasmid. *J Bacteriol* **180**(5): 1185-93.

Akita, E. M. and S. Nakai 1993a. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods* **160**(2): 207-14.

Akita, E. M. and S. Nakai 1993b. Production and purification of Fab' fragments from chicken egg yolk immunoglobulin Y (IgY). *J Immunol Methods* **162**(2): 155-64.

Albert, M. J., K. Alam, M. Islam, J. Montanaro, A. S. M. Hamidur Rahman, K. Haider, M. A. Hossain, A. K. M. G. Kibriya and S. Tzipori 1991. *Hafnia alvei*, a probable cause of diarrhea in humans. *Infect Immun* **59**(4): 1507-13.

Albert, M. J., S. M. Faruque, M. Ansaruzzaman, M. M. Islam, K. Haider, K. Alam, I. Kabir and R. Robins-Browne 1992. Sharing of virulence-associated properties at the phenotypic and genetic levels between *Escherichia coli* and *Hafnia alvei*. *J Med Microbiol* **37**: 310-314.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and J. D. Watson 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York, Garland Publishing.

Aldea, M., T. Garrido, J. Pla and M. Vicente 1990. Division genes in *Escherichia coli* are expressed coordinately to cell septum requirements by gearbox promoters. *Embo J* **9**(11): 3787-94.

Allcock, G. H., M. Allegra, R. J. Flower and M. Perretti 2001. Neutrophil accumulation induced by bacterial lipopolysaccharide: effects of dexamethasone and annexin 1. *Clin Exp Immunol* **123**(1): 62-7.

An, H., J. M. Fairbrother, J. D. Dubreuil and J. Harel 1997. Cloning and characterization of the *eae* gene from dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221. *FEMS Microbiol Lett* **148**(2): 239-45.

An, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels and J. Harel 1999a. Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **473**: 179-84.

An, H., J. M. Fairbrother, J. D. Dubreuil and J. Harel 1999b. Cloning and characterization of the *esp* region from a dog attaching and effacing *Escherichia coli* strain 4221 and detection of EspB protein-binding to HEp-2 cells. FEMS Microbiol Lett **174**(2): 215-23.

An, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels, T. Mabrouk, D. Dugourd, H. Dezfulian and J. Harel 2000. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. Microb Pathog **28**(5): 291-300.

Badea, L., S. Doughty, L. Nicholls, J. Sloan, R. M. Robins-Browne and E. L. Hartland 2003. Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. Microb Pathog **34**(5): 205-15.

Bain, C., R. Keller, G. K. Collington, L. R. Trabulsi and S. Knutton 1998. Increased levels of intracellular calcium are not required for the formation of attaching and effacing lesions by enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun **66**(8): 3900-8.

Baldini, M. M., J. B. Kaper, M. M. Levine, D. C. A. Candy and H. W. Moon 1983. Plasmid-mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. J Pediatr Gastroenterol **2**: 534-38.

Baldini, M. M., J. P. Nataro and J. B. Kaper 1986. Localization of a determinant for HEp-2 adherence by enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun **52**: 334-36.

Baldwin, T. J., W. Eard, A. Aitken, S. Knutton and P. H. Williams 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun **59**: 1599-1604.

Barondess, J. J. and J. Beckwith 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature* **346**(6287): 871-4.

Batchelor, M., J. Guignot, A. Patel, N. Cummings, J. Cleary, S. Knutton, D. W. Holden, I. Connerton and G. Frankel 2004. Involvement of the intermediate filament protein cytokeratin-18 in actin pedestal formation during EPEC infection. *EMBO Rep* **5**(1): 104-10.

Batisson, I., M. P. Guimond, F. Girard, H. An, C. Zhu, E. Oswald, J. M. Fairbrother, M. Jacques and J. Harel 2003. Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the adhesion mechanism of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(8): 4516-25.

Batt, R. M., C. A. Hart, L. McLean and J. R. Saunders 1987. Organ culture of rabbit ileum as a model for the investigation of the mechanism of intestinal damage by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Gut* **28**(10): 1283-90.

Batt, R. M., H. Embaye, J. Hunt and C. A. Hart 1989. Ultrastructural damage to equine intestinal epithelium induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Equine Vet J* **21**(5): 373-5.

Beaudry, M., C. Zhu, J. M. Fairbrother and J. Harel 1996. Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* isolates from dogs manifesting attaching and effacing lesions. *J Clin Microbiol* **34**(1): 144-8.

Beaulieu, J. F. 1992. Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt- villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* **102**: 427-36.

Beier, R. and A. Gebert 1998. Kinetics of particle uptake in the domes of Peyer's patches. *Am J Physiol* **275**: G130-8.

Beinke, C., S. Laarmann, C. Wachter, H. Karch, L. Greune and M. A. Schmidt 1998. Diffusely adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. *Infect Immun* **66**(2): 528-39.

Ben-Ami, G., V. Ozeri, E. Hanski, F. Hofmann, K. Aktories, K. M. Hahn, G. M. Bokoch and I. Rosenshine 1998. Agents that inhibit Rho, Rac, and Cdc42 do not block formation of actin pedestals in HeLa cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **66**(4): 1755-8.

Bernardi, P., L. Scorrano, R. Colonna, V. Petronilli and F. Di Lisa 1999. Mitochondria and cell death. Mechanistic aspects and methodological issues. *Eur J Biochem* **264**(3): 687-701.

Beutin, L. 1999. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet Res* **30**(2-3): 285-98.

Bhogal, B. S., L. K. Nagy and P. D. Walker 1987. Neutrophil mediated and IgA dependent antibacterial immunity against enteropathogenic *Escherichia coli* in the porcine intestinal mucosa. *Vet Immunol Immunopathol* **14**(1): 23-44.

Bianchi, A. T. and P. J. van der Heijden 1994. Antigen presenting cells and B-cells in the pig. *Vet Immunol Immunopathol* **43**(1-3): 63-8.

Bieber, D., S. W. Ramer, C. Y. Wu, W. J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez and G. K. Schoolnik 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **280**(5372): 2114-8.

Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao 1997.

The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331): 1453-74.

Blum, G., M. Ott, A. Lischewski, A. Ritter, H. Imrich, H. Tschape and J. Hacker 1994. Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect Immun* **62**(2): 606-14.

Boullier, S., J. P. Nougayrede, O. Marches, C. Tasca, M. Boury, E. Oswald, J. De Rycke and A. Milon 2003. Genetically engineered enteropathogenic *Escherichia coli* strain elicits a specific immune response and protects against a virulent challenge. *Microbes Infect* **5**(10): 857-67.

Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**(3): 459-72.

Brandtzaeg, P. and K. Tolo 1982. Mucosal permeability enhanced by serum-derived antibodies. *Nature* **266**: 262-3.

Broes, A., R. Drolet, M. Jacques, J. M. Fairbrother and W. M. Johnson 1988. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. *Can J Vet Res* **52**(2): 280-2.

Brunetti, M., N. Mascetra, N. Martelli, F. O. Ranelletti, P. Musiani and F. B. Aiello 2002. Synergistic inhibitory activities of interleukin-10 and dexamethasone on human CD4⁺ T cells. *Transplantation* **74**(8): 1152-8.

Campellone, K. G., A. Giese, D. J. Tipper and J. M. Leong 2002. A tyrosine-phosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol Microbiol* **43**(5): 1227-41.

Campellone, K. G., D. Robbins and J. M. Leong 2004. EspF_U is a translocated EHEC effector that interacts with Tir and N-WASP and promotes Nck-independent actin assembly. *Dev Cell* **7**(2): 217-28.

Canil, C., I. Rosenshine, S. Ruschkowski, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper and B. B. Finlay 1993. Enteropathogenic *Escherichia coli* decreases the transepithelial electrical resistance of polarized epithelial monolayers. *Infect Immun* **61**(7): 2755-62.

Cantey, J. R. and R. K. Blake 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in rabbit: a novel mechanism. *J Infect Dis* **135**: 454-62.

Cantey, J. R., L. R. Inman and R. K. Blake 1989. Production of diarrhea in the rabbit by a mutant of *Escherichia coli* (RDEC-1) that does not express adherence (AF/R1) pili. *J Infect Dis* **160**(1): 136-41.

Carlander, D., H. Kollberg, P. E. Wejaker and A. Larsson 2000. Peroral immunotherapy with yolk antibodies for the prevention and treatment of enteric infections. *Immunol Res* **21**(1): 1-6.

Carvalho, V. M., C. L. Gyles, K. Ziebell, M. A. Ribeiro, J. L. Catao-Dias, I. L. Sinhorini, J. Otman, R. Keller, L. R. Trabulsi and A. F. Pestana de Castro 2003. Characterization of monkey enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and human typical and atypical EPEC serotype isolates from neotropical nonhuman primates. *J Clin Microbiol* **41**(3): 1225-34.

Ceponis, P. J., D. M. McKay, J. C. Ching, P. Pereira and P. M. Sherman 2003. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 disrupts Stat1-mediated gamma interferon signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* **71**(3): 1396-404.

Chakravortty, D. and K. S. Kumar 1999. Interaction of lipopolysaccharide with human small intestinal lamina propria fibroblasts favors neutrophil migration and

peripheral blood mononuclear cell adhesion by the production of proinflammatory mediators and adhesion molecules. *Biochim Biophys Acta* **1453**(2): 261-72.

Charpentier, X. and E. Oswald 2004. Identification of the secretion and translocation domain of the enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* effector Cif, using TEM-1 beta-lactamase as a new fluorescence-based reporter. *J Bacteriol* **186**(16): 5486-95.

Chen, X., T. Murakami, J. J. Oppenheim and O. M. Howard 2004. Differential response of murine CD4+CD25+ and CD4+CD25- T cells to dexamethasone-induced cell death. *Eur J Immunol* **34**(3): 859-69.

Cheon, D. S. and C. Chae 2001. Distribution of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in stillborn and liveborn piglets from experimentally infected sows. *J Comp Pathol* **124**(4): 231-7.

China, B., V. Pirson, E. Jacquemin, P. Pohl and J. G. Mainil 1997. Pathotypes of bovine verotoxigenic *Escherichia coli* isolates producing attaching/effacing (AE) lesions in the ligated intestinal loop assay in rabbits. *Adv Exp Med Biol* **412**: 311-6.

Choi, C., W. S. Cho, B. Kim and C. Chae 2002. Expression of Interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in pigs experimentally infected with Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus (PRRSV). *J Comp Pathol* **127**(2-3): 106-13.

Clark, M. A., B. H. Hirst and M. A. Jepson 1998. M-cell surface beta1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infect Immun* **66**(3): 1237-43.

Cleary, J., L. C. Lai, R. K. Shaw, A. Straatman-Iwanowska, M. S. Donnenberg, G. Frankel and S. Knutton 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)

adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* **150**(Pt 3): 527-38.

Collington, G. K., I. W. Booth, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper and S. Knutton 1998a. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes encoding secreted signalling proteins are essential for modulation of Caco-2 cell electrolyte transport. *Infect Immun* **66**(12): 6049-53.

Collington, G. K., I. W. Booth and S. Knutton 1998b. Rapid modulation of electrolyte transport in Caco-2 cell monolayers by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection. *Gut* **42**(2): 200-7.

Crane, J. K. and J. S. Oh 1997. Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**(8): 3277-85.

Crane, J. K., B. P. McNamara and M. S. Donnenberg 2001. Role of EspF in host cell death induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**(4): 197-211.

Cravioto, A., R. Gross, S. Scotland and B. Rowe 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* **3**: 95-99.

Cravioto, A., A. Tello, A. Nataro, J. Ruiz, S. Del Vedovo and J. R. Neeser 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhea. *The Lancet* **337**(Feb 2): 262-64.

Crawford, J. A. and J. B. Kaper 2002. The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol* **46**(3): 855-68.

Czerucka, D., S. Dahan, B. Mograbi, B. Rossi and P. Rampal 2001. Implication of mitogen-activated protein kinases in T84 cell responses to enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **69**(3): 1298-305.

Dahan, S., S. Knutton, R. K. Shaw, V. F. Crepin, G. Dougan and G. Frankel 2004. Transcriptome of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 adhering to eukaryotic plasma membranes. *Infect Immun* **72**(9): 5452-9.

Dahan, S., S. Wiles, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, M. P. Stevens, R. K. Shaw, Y. Chong, S. Knutton, A. Phillips and G. Frankel 2005. EspJ Is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect Immun* **73**(2): 679-86.

Dalrymple, S. A., R. Slattery, D. M. Aud, M. Krishna, L. A. Lucian and R. Murray 1996. Interleukin-6 is required for a protective immune response to systemic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **64**(8): 3231-3235.

de Grado, M., C. M. Rosenberger, A. Gauthier, B. A. Vallance and B. B. Finlay 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection induces expression of the early growth response factor by activating mitogen-activated protein kinase cascades in epithelial cells. *Infect Immun* **69**(10): 6217-24.

de Souza Campos Fernandes, R. C., V. M. Quintana Flores and E. Medina-Acosta 2002. Prevalent transfer of human colostral IgA antibody activity for the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus structural repeating subunit A in neonates. *Diagn Microbiol Infect Dis* **44**(4): 331-6.

de Verdugo, U. R., H. C. Selinka, M. Huber, B. Kramer, J. Kellermann, P. H. Hofschneider and R. Kandolf 1995. Characterization of a 100-kilodalton binding protein for the six serotypes of coxsackie B viruses. *J Virol* **69**(6751-57).

Dean, P. and B. Kenny 2004. Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein. *Mol Microbiol* **54**(3): 665-75.

Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth and H. W. Moon 1997a. Pathogenesis of O157:H7 *Escherichia coli* infection in neonatal calves. *Adv Exp Med Biol* **412**: 47-51.

Dean-Nystrom, E. A., B. T. Bosworth, W. C. Cray, Jr. and H. W. Moon 1997b. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infect Immun* **65**(5): 1842-8.

Dean-Nystrom, E. A., J. F. Pohlenz, H. W. Moon and A. D. O'Brien 2000. *Escherichia coli* O157:H7 causes more-severe systemic disease in suckling piglets than in colostrum-deprived neonatal piglets. *Infect Immun* **68**(4): 2356-8.

Dean-Nystrom, E. A., L. J. Gansheroff, M. Mills, H. W. Moon and A. D. O'Brien 2002. Vaccination of pregnant dams with intimin(O157) protects suckling piglets from *Escherichia coli* O157:H7 infection. *Infect Immun* **70**(5): 2414-8.

Dean-Nystrom, E. A., A. R. Melton-Celsa, J. F. Pohlenz, H. W. Moon and A. D. O'Brien 2003. Comparative pathogenicity of *Escherichia coli* O157 and intimin-negative non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli* strains in neonatal pigs. *Infect Immun* **71**(11): 6526-33.

DebRoy, C. and C. W. Maddox 2001. Identification of virulence attributes of gastrointestinal *Escherichia coli* isolates of veterinary significance. *Anim Health Res Rev* **2**(2): 129-40.

Deibel, C., S. Kramer, T. Chakraborty and F. Ebel 1998. EspE, a novel secreted protein of attaching and effacing bacteria, is directly translocated into infected host

cells, where it appears as a tyrosine-phosphorylated 90 kDa protein. *Mol Microbiol* **28**(3): 463-74.

Deibel, C., P. Dersch and F. Ebel 2001. Intimin from Shiga toxin-producing *Escherichia coli* and its isolated C-terminal domain exhibit different binding properties for Tir and a eukaryotic surface receptor. *Int J Med Microbiol* **290**(8): 683-91.

Deng, W., B. A. Vallance, Y. Li, J. L. Puente and B. B. Finlay 2003. *Citrobacter rodentium* translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice. *Mol Microbiol* **48**(1): 95-115.

Devereux, J., P. Haeblerli and O. Smithies 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**(1 Pt 1): 387-95.

DeVinney, R., D. G. Knochel and B. B. Finlay 1999a. Enteropathogenic *Escherichia coli*: cellular harassment. *Current Opinion in Microbiology* **2**: 83-8.

DeVinney, R., M. Stein, D. Reinscheid, A. Abe, S. Ruschkowski and B. B. Finlay 1999b. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 produces Tir, which is translocated to the host cell membrane but is not tyrosine phosphorylated. *Infect Immun* **67**(5): 2389-98.

Donnenberg, M. S., A. Donohue-Rolfe and G. T. Keusch 1989. Epithelial cell invasion: an overlooked property of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) associated with the EPEC adherence factor. *J Infect Dis* **160**(3): 452-59.

Donnenberg, M. S., A. Donohue-Rolfe and G. T. Keusch 1990a. A comparison of HEp-2 cell invasion by enteropathogenic and enteroinvasive *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **57**(1-2): 83-6.

Donnenberg, M. S., S. B. Calderwood, A. Donohue-Rolfe, G. T. Keusch and J. B. Kaper 1990b. Construction and analysis of *TnphoA* mutants of enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEp-2 cells. *Infect Immun* **58**(6): 1565-71.

Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper 1991. Construction of an *eae* deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun* **59**(12): 4310-7.

Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **60**: 3953-61.

Donnenberg, M. S., J. A. Giron, J. P. Nataro and J. B. Kaper 1992. A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Mol Microbiol* **6**(22): 3427-37.

Donnenberg, M. S., J. Yu and J. B. Kaper 1993a. A second chromosomal gene necessary for intimate attachment of enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J Bacteriol* **175**: 4670-80.

Donnenberg, M. S., S. Tzipori, M. L. McKee, A. D. O'Brien, J. Alroy and J. B. Kaper 1993b. The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment *in vitro* and in a porcine model. *J Clin Invest* **92**(3): 1418-24.

Donnenberg, M. S., H. Z. Zhang and K. D. Stone 1997a. Biogenesis of the bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*: reconstitution of fimbriae in recombinant *E. coli* and role of DsbA in pilin stability--a review. *Gene* **192**(1): 33-8.

Donnenberg, M. S., J. B. Kaper and B. B. Finlay 1997b. Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Trends Microbiol* **5**(3): 109-14.

Donnenberg, M. S. 1999. Interaction between enteropathogenic *Escherichia coli* and epithelial cells. Clin Infect Dis **28**: 451-5.

Doughty, S., J. Sloan, V. Bennett-Wood, M. Robertson, R. M. Robins-Browne and E. L. Hartland 2002. Identification of a novel fimbrial gene cluster related to long polar fimbriae in locus of enterocyte effacement-negative strains of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect Immun **70**(12): 6761-9.

Dozois, C. M., E. Oswald, N. Gautier, J. P. Serthelon, J. M. Fairbrother and I. P. Oswald 1997. A reverse transcription-polymerase chain reaction method to analyze porcine cytokine gene expression. Vet Immunol Immunopathol **58**(3-4): 287-300.

Drolet, R., J. M. Fairbrother, J. Harel and P. Hélie 1994. Attaching and effacing and enterotoxigenic *Escherichia coli* associated with enteric colibacillosis in the dog. Can J Vet Res **58**: 87-92.

Dubreuil, J. D. 1999. Enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxins. The Comprehensive Sourcebook of Bacterial Protein Toxins. J. E. Alouf and J. H. Freer. Rithamigsburgh, England, Academic Press: 525-44.

Dytoc, M., L. Fedorko and P. M. Sherman 1994. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli in vitro*. Gastroenterology **106**(5): 1150-61.

Dziedzic, T., I. Wybranska, A. Dembinska-Kiec, A. Klimkowicz, A. Slowik, J. Pankiewicz, A. Zdzienicka and A. Szczudlik 2003. Dexamethasone inhibits TNF-alpha synthesis more effectively in Alzheimer's disease patients than in healthy individuals. Dement Geriatr Cogn Disord **16**(4): 283-6.

Dziva, F., P. M. van Diemen, M. P. Stevens, A. J. Smith and T. S. Wallis 2004. Identification of *Escherichia coli* O157:H7 genes influencing colonization of the

bovine gastrointestinal tract using signature-tagged mutagenesis. *Microbiology* **150**(Pt 11): 3631-45.

Ebel, F., C. Deibel, A. U. Kresse, C. A. Guzman and T. Chakraborty 1996. Temperature- and medium-dependent secretion of proteins by Shiga toxin- producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **64**(11): 4472-9.

Ebel, F., C. von Eichel-Streiber, M. Rohde and T. Chakraborty 1998a. Small GTP-binding proteins of the *Rho*- and *Ras*-subfamilies are not involved in the actin rearrangements induced by attaching and effacing *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **163**: 107-12.

Ebel, F., T. Podzadel, M. Rohde, A. U. Kresse, S. Främer, C. Deibel, C. A. Guzman and T. Chakraborty 1998b. Initial binding of shiga toxin-producing *Escherichia coli* to host cells and subsequent induction of actin rearrangements depend on filamentous EspA-containing surface appendages. *Mol Microbiol* **30**(1): 147-61.

Ebina, T., K. Tsukada, K. Umezu, M. Nose, K. Tsuda, H. Hatta, M. Kim and T. Yamamoto 1990. Gastroenteritis in suckling mice caused by human rotavirus can be prevented with egg yolk immunoglobulin (IgY) and treated with a protein-bound polysaccharide preparation (PSK). *Microbiol Immunol* **34**(7): 617-29.

Eckmann, L., M. F. Kagnoff and J. Fierer 1995. Intestinal epithelial cells as watchdogs for the natural immune system. *Trends Microbiol* **3**(3): 118-20.

Edwards, P. R. and W. H. Ewing 1972. Identification of *Enterobacteriaceae*. Minneapolis, Minn., Burgess Publishing Co.: 82-105.

Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. Deng, L. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1998. The complete sequence

of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* **28**(1): 1-4.

Elliott, S. J., J. Yu and J. B. Kaper 1999a. The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infect Immun* **67**(8): 4260-3.

Elliott, S. J., S. W. Hutcheson, M. S. Dubois, J. L. Mellies, L. A. Wainwright, M. Batchelor, G. Frankel, S. Knutton and J. B. Kaper 1999b. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **33**(6): 1176-89.

Elliott, S. J., V. Sperandio, J. A. Giron, S. Shin, J. L. Mellies, L. Wainwright, S. W. Hutcheson, T. K. McDaniel and J. B. Kaper 2000. The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**(11): 6115-26.

Elliott, S. J., E. O. Krejany, J. L. Mellies, R. M. Robins-Browne, C. Sasakawa and J. B. Kaper 2001. EspG, a novel type III system-secreted protein from enteropathogenic *Escherichia coli* with similarities to VirA of *Shigella flexneri*. *Infect Immun* **69**(6): 4027-33.

Engleberg, N. C., A. Heath, A. Miller, C. Rivera and V. J. DiRita 2001. Spontaneous mutations in the CsrRS two-component regulatory system of *Streptococcus pyogenes* result in enhanced virulence in a murine model of skin and soft tissue infection. *J Infect Dis* **183**(7): 1043-54.

Escherich, T. V. 1885. Die Darmbakterien des Neugeborenen und Säuglings. *Fortschritte der Medizin* **3**(16): 515-22.

Everiss, K. D., K. J. Hughes and K. M. Peterson 1994. The accessory colonization factor and toxin-coregulated pilus gene clusters are physically linked on the *Vibrio cholerae* 0395 chromosome. *DNA Seq* **5**(1): 51-5.

Fagundes-Neto, U. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants : clinical aspects and small bowel morphological alterations. *Rev Microbiol* **27**: 117-19.

Fairbrother, J. M. 1992. Enteric colibacillosis. *Diseases of swine*. A. D. Leman, B. E. Straw, W. L. Mengeling, S. D'Allaire and D. J. Taylor. Iowa, Iowa State University Press: 489-97.

Fairbrother, J. M. 1999. Guide des mécanismes de pathogénie et des facteurs de virulence des maladies animales causées par *Escherichia coli*, Publication de l'Université de Montréal.

Farris, M., A. Grant, T. B. Richardson and C. D. O'Connor 1998. BipA: a tyrosine-phosphorylated GTPase that mediates interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells. *Mol Microbiol* **28**(2): 265-79.

Feder, I., F. M. Wallace, J. T. Gray, P. Fratamico, P. J. Fedorka-Cray, R. A. Pearce, J. E. Call, R. Perrine and J. B. Luchansky 2003. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from intact colon fecal samples of swine. *Emerg Infect Dis* **9**(3): 380-3.

Feng, W.-H., S. M. Laster, M. Tomkins, T. Brown, J.-S. Xu, C. Altier, W. Gomez, D. Benfield and M. B. McCaw 2001. *In utero* infection by porcine reproductive and respiratory syndrome virus is sufficient to increase susceptibility of piglets to challenge by *Streptococcus suis* type II. *J Virol* **75**(10): 4889-95.

Filipenko, N. R. and D. M. Waisman 2001. The C terminus of annexin II mediates binding to F-actin. *J Biol Chem* **276**(7): 5310-5.

Finlay, B. B., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1992. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun* **60**: 2541-43.

Finlay, B. B. and S. Falkow 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**(2): 136-69.

Fitzhenry, R. J., S. Reece, L. R. Trabulsi, R. Heuschkel, S. Murch, M. Thomson, G. Frankel and A. D. Phillips 2002. Tissue tropism of enteropathogenic *Escherichia coli* strains belonging to the O55 serogroup. *Infect Immun* **70**(8): 4362-8.

Fitzhenry, R. J., D. J. Pickard, E. L. Hartland, S. Reece, G. Dougan, A. D. Phillips and G. Frankel 2003a. Intimin type influences the site of human intestinal mucosal colonisation by enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Gut* **50**(2): 180-5.

Fitzhenry, R. J., M. P. Stevens, C. Jenkins, T. S. Wallis, R. Heuschkel, S. Murch, M. Thomson, G. Frankel and A. D. Phillips 2003b. Human intestinal tissue tropism of intimin epsilon O103 *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* **218**(2): 311-6.

Foubister, V., I. Rosenshine and B. B. Finlay 1994a. A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J Exp Med* **179**(3): 993-8.

Foubister, V., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg and B. B. Finlay 1994b. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. *Infect Immun* **62**: 3038-40.

Fournout, S., C. M. Dozois, M. Odin, C. Desautels, S. Peres, F. Herault, F. Daigle, C. Segafredo, J. Laffitte, E. Oswald, J. M. Fairbrother and I. P. Oswald

2000. Lack of a role of cytotoxic necrotizing factor 1 toxin from *Escherichia coli* in bacterial pathogenicity and host cytokine response in infected germfree piglets. *Infect Immun* **68**(2): 839-47.

Francis, C. L., A. E. Jerse, J. B. Kaper and S. Falkow 1991. Characterization of interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 with mammalian cells *in vitro*. *J Infect Dis* **164**(4): 693-703.

Francis, D. H., J. E. Collins and J. R. Duimstra 1986. Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect Immun* **51**(3): 953-6.

Frankel, G., D. C. Candy, P. Everest and G. Dougan 1994. Characterization of the C-terminal domains of intimin-like proteins of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Citrobacter freundii*, and *Hafnia alvei*. *Infect Immun* **62**(5): 1835-42.

Frankel, G., D. C. Candy, E. Fabiani, J. Adu-Bobie, S. Gil, M. Novakova, A. D. Phillips and G. Dougan 1995. Molecular characterization of a carboxy-terminal eukaryotic-cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**: 4323-28.

Frankel, G., O. Lider, R. Hershkovich, A. P. Mould, S. G. Kachalsky, D. C. Candy, L. Cahalon, M. J. Humphries and G. Dougan 1996. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem* **271**(34): 20359-64.

Frankel, G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper and S. Knutton 1998a. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol* **30**(5): 911-21.

Frankel, G., A. D. Philips, M. Novakova, M. Batchelor, S. Hicks and G. Dougan 1998b. Generation of *Escherichia coli* intimin derivatives with differing biological activities using site-directed mutagenesis of the intimin C-terminus domain. *Mol Microbiol* **29**(2): 559-70.

Galina, L., C. Pijoan, M. Sitjar, W. T. Christianson, K. Rossow and J. E. Collins 1994. Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet Rec* **134**(3): 60-4.

Gannon, V. P. J., M. Rashed, R. K. King and E. J. Golsteyn Thomas 1993. Detection and characterization of the *eae* gene of Shiga-Like toxin-producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* **31**(5): 1268-74.

Garmendia, J., A. D. Phillips, M. F. Carlier, Y. Chong, S. Schuller, O. Marches, S. Dahan, E. Oswald, R. K. Shaw, S. Knutton and G. Frankel 2004. TccP is an enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 type III effector protein that couples Tir to the actin-cytoskeleton. *Cell Microbiol* **6**(12): 1167-83.

Garmendia, J., G. Frankel and V. F. Crepin 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun* **73**(5): 2573-85.

Gauthier, A. and B. B. Finlay 2003. Translocated intimin receptor and its chaperone interact with ATPase of the type III secretion apparatus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **185**(23): 6747-55.

Gebert, A., H. J. Rothkotter and R. Pabst 1994. Cytokeratin 18 is an M-cell marker in porcine Peyer's patches. *Cell Tissue Res* **276**(2): 213-21.

Gebert, A., S. Fassbender, K. Werner and A. Weissferdt 1999. The development of M cells in Peyer's patches is restricted to specialized dome-associated crypts. *Am J Pathol* **154**(5): 1573-82.

Gerke, V. and S. E. Moss 1997. Annexins and membrane dynamics. *Biochim Biophys Acta* **1357**(2): 129-54.

Ghaem-Maghami, M., C. P. Simmons, S. Daniell, M. Pizza, D. Lewis, G. Frankel and G. Dougan 2001. Intimin-specific immune responses prevent bacterial colonization by the attaching-effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **69**(9): 5597-605.

Ginisty, H., H. Sicard, B. Roger and P. Bouvet 1999. Structure and functions of nucleolin. *J Cell Sci* **112**: 761-72.

Girón, J. A., A. S. Ho and G. K. Schoolnik 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**(5032): 710-3.

Girón, J. A., K. G. Gicquelais and M. S. Donnenberg 1992. Distribution of the bundle-forming pilus (*bfp*) gene among enteropathogenic *Escherichia coli*. 92 Annu. Meet. A. Soc. Microbiol.

Goffaux, F., J. Mainil, V. Pirson, G. Charlier, P. Pohl, E. Jacquemin and B. China 1997. Bovine attaching and effacing *Escherichia coli* possess a pathogenesis island related to the LEE of the human enteropathogenic *Escherichia coli* strain E2348/69. *FEMS Microbiol Lett* **154**(2): 415-21.

Gomez-Duarte, O. G. and J. B. Kaper 1995. A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**(5): 1767-76.

Goncalves, N. S., C. Hale, G. Dougan, G. Frankel and T. T. MacDonald 2003. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to lymphocytes and its functional consequences. *Infect Immun* **71**(5): 2960-5.

Gonzalez Garcia, E. A. 2002. Animal health and foodborne pathogens: enterohaemorrhagic O157:H7 strains and other pathogenic *Escherichia coli* virotypes (EPEC, ETEC, EIEC, EHEC). *Pol J Vet Sci* **5**(2): 103-15.

Goosney, D. L., D. G. Knochel and B. B. Finlay 1999. Enteropathogenic *E. coli*, *Salmonella*, and *Shigella*: masters of host cell cytoskeletal exploitation. *Emerg Infect Dis* **5**(2): 216-23.

Goosney, D. L., R. DeVinney, R. A. Pfuetzner, E. A. Frey, N. C. Strynadka and B. B. Finlay 2000. Enteropathogenic *E. coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with alpha-actinin. *Curr Biol* **10**(12): 735-8.

Gottschalk, M., A. Lebrun, H. Wisselink, J. D. Dubreuil, H. Smith and U. Vecht 1998. Production of virulence-related proteins by Canadian strains of *Streptococcus suis* capsular type 2. *Can J Vet Res* **62**(1): 75-9.

Groisman, E. A. and H. Ochman 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* **87**(5): 791-4.

Gruenheid, S., R. DeVinney, F. Blatt, D. Goosney, S. Gelkop, G. D. Gish, T. Pawson and B. B. Finlay 2001. Enteropathogenic *E. coli* Tir binds Nck to initiate actin pedestal formation in host cells. *Nat Cell Biol* **3**: 856-9.

Gyles, C. L. 1992. *Escherichia coli* cytotoxins and enterotoxins. *Can J Microbiol* **38**(7): 734-46.

Gyles, C. L. and J. M. Fairbrother 2004. *Escherichia coli*. Pathogenesis of bacterial infections in animals. C. L. Gyles, J. F. Prescott, J. G. Songer and C. O. Thoen, Blackwell Publishing Ltd.: 193-223.

Hacker, J. 1992. Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections. Can J Microbiol **38**(7): 720-7.

Hamanaka, Y., M. Nakashima, A. Wada, M. Ito, H. Kurazono, H. Hojo, Y. Nakahara, S. Kohno, T. Hirayama and I. Sekine 2001. Expression of human beta-defensin 2 (hBD-2) in *Helicobacter pylori* induced gastritis: antibacterial effect of hBD-2 against *Helicobacter pylori*. Gut **49**(4): 481-7.

Hardt, W. D., L. M. Chen, K. E. Schuebel, X. R. Bustelo and J. E. Galan 1998. *S. typhimurium* encodes an activator of Rho GTPases that induces membrane ruffling and nuclear responses in host cells. Cell **93**(5): 815-26.

Hardwidge, P. R., I. Rodriguez-Escudero, D. Goode, S. Donohoe, J. Eng, D. R. Goodlett, R. Aebersold and B. B. Finlay 2004. Proteomic analysis of the intestinal epithelial cell response to enteropathogenic *Escherichia coli*. J Biol Chem **279**(19): 20127-36.

Harel, J., H. Lapointe, A. Fallara, L. A. Lortie, M. Bigras-Poulin, S. Lariviere and J. M. Fairbrother 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. J Clin Microbiol **29**(4): 745-52.

Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1992. Isolation and characterization of adhesin-defective TnphoA mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. J Gen Microbiol **138**(Pt 11): 2337-45.

Harel, J., M. Jacques, J. M. Fairbrother, M. Bosse and C. Forget 1995. Cloning of determinants encoding F165(2) fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiology* **141**(Pt 1): 221-8.

Hartland, E. L., M. Batchelor, R. M. Delahay, C. Hale, S. Matthews, G. Dougan, S. Knutton, I. Connerton and G. Frankel 1999. Binding of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* to Tir and to host cells. *Mol Microbiol* **32**(1): 151-8.

Hartland, E. L., V. Huter, L. M. Higgins, N. S. Goncalves, G. Dougan, A. D. Phillips, T. T. MacDonald and G. Frankel 2000. Expression of intimin gamma from enterohemorrhagic *Escherichia coli* in *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* **68**(8): 4637-46.

Hauf, N. and T. Chakraborty 2003. Suppression of NF-kappa B activation and proinflammatory cytokine expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J Immunol* **170**(4): 2074-82.

Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori and H. Shinagawa 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**(1): 11-22.

Hecht, G. and A. Koutsouris 1999. Enteropathogenic *Escherichia coli* attenuates secretagogue-induced net intestinal ion transport but not Cl⁻ secretion. *Am J Physiol* **276**(3 Pt 1): G781-788.

Hecht, G., J. A. Marrero, A. Danilkovich, K. A. Matkowskyj, S. D. Savkovic, A. Koutsouris and R. V. Benya 1999. Pathogenic *Escherichia coli* increase Cl-

secretion from intestinal epithelia by upregulating galanin-1 receptor expression. *J Clin Invest* **104**(3): 253-62.

Hedges, S. R., W. W. Agace and C. Svanborg 1995. Epithelial cytokine responses and mucosal cytokine networks. *Trends Microbiol* **3**(7): 266-70.

Hélie, P., M. Morin, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45: K"E65" strain. *Infect Immun* **59**(3): 814-21.

Hicks, S., G. Frankel, J. B. Kaper, G. Dougan and A. D. Phillips 1998. Role of intimin and bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion to pediatric intestinal tissue *in vitro*. *Infect Immun* **66**(4): 1570-8.

Higgins, R., J., G. Pearson, R. and C. Wray 1997. Attaching and effacing *E. coli*: Microscopic and ultrastructural observations of intestinal infections in pigs. *Adv Exp Med Biol* **412**: 59-62.

Higgins, L. M., G. Frankel, G. Douce, G. Dougan and T. T. MacDonald 1999a. *Citrobacter rodentium* infection in mice elicits a mucosal Th1 cytokine response and lesions similar to those in murine inflammatory bowel disease. *Infect Immun* **67**(6): 3031-39.

Higgins, L. M., G. Frankel, I. Connerton, N. S. Goncalves, G. Dougan and T. T. MacDonald 1999b. Role of bacterial intimin in colonic hyperplasia and inflammation. *Science* **285**(5427): 588-91.

Holt, J. G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore, Williams and Wilkins.

Hu, X., W. P. Li, C. Meng and L. B. Ivashkiv 2003. Inhibition of IFN-gamma signaling by glucocorticoids. *J Immunol* **170**(9): 4833-9.

Hueck, C. J. 1998. Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* **62**(2): 379-433.

Ide, T., S. Laarmann, L. Greune, H. Schillers, H. Oberleithner and M. A. Schmidt 2001. Characterization of translocation pores inserted into plasma membranes by type III-secreted Esp proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **3**(10): 669-79.

Ihle, J. N. 2001. The Stat family in cytokine signaling. *Curr Opin Cell Biol* **13**(2): 211-7.

Imberechts, H., P. Deprez, E. Van Driessche and P. Pohl 1997. Chicken egg yolk antibodies against F18ab fimbriae of *Escherichia coli* inhibit shedding of F18 positive *E. coli* by experimentally infected pigs. *Vet Microbiol* **54**: 329-41.

Inman, L. R. and J. R. Cantey 1984. Peyer's patch lymphoid follicle epithelial adherence of a rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* (strain RDEC-1). Role of plasmid-mediated pili in initial adherence. *J Clin Invest* **74**(1): 90-5.

Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc and P. M. Sherman 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**(9): 3316-26.

Ismaili, A., B. Bourke, J. C. de Azavedo, S. Ratnam, M. A. Karmali and P. M. Sherman 1996. Heterogeneity in phenotypic and genotypic characteristics among strains of *Hafnia alvei*. *J Clin Microbiol* **34**(12): 2973-9.

Isogai, E., H. Isogai, K. Hirose, T. Kubota, K. Kimura, N. Fujii, S. Hayashi, K. Takeshi and K. Oguma 2001. Therapeutic effect of anti-TNF-alpha antibody and levofloxacin (LVFX) in a mouse model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 infection. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **24**(4): 217-31.

Jallat, C., V. Livrelli, A. Darfeuille-Michaud, C. Rich and B. Joly 1993. *Escherichia coli* strains involved in diarrhea in France: high prevalence and heterogeneity of diffusely adhering strains. *J Clin Microbiol* **31**(8): 2031-7.

Jallat, C., A. Darfeuille-Michaud, C. Rich and B. Joly 1994. Survey of clinical isolates of diarrhoeogenic *Escherichia coli*: diffusely adhering *E. coli* strains with multiple adhesive factors. *Res Microbiol* **145**(8): 621-32.

Janke, B. H., D. H. Francis, J. E. Collins, M. C. Libal, D. H. Zeman and D. D. Johnson 1989. Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Invest* **1**: 6-11.

Jarvis, K. G., J. A. Girón, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching-effacing lesions formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7996-8000.

Jarvis, K. G. and J. B. Kaper 1996. Secretion of extracellular proteins by enterohemorrhagic *Escherichia coli* via a putative type III secretion system. *Infect Immun* **64**(11): 4826-9.

Jepson, M. A. and M. A. Clark 1998. Studying M cells and their role in infection. *Trends Microbiol* **6**(9): 359-65.

Jepson, M. A., S. Pellegrin, L. Peto, D. N. Banbury, A. D. Leard, H. Mellor and B. Kenny 2003. Synergistic roles for the Map and Tir effector molecules in

mediating uptake of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) into non-phagocytic cells. Cell Microbiol 5(11): 773-83.

Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall and J. B. Kaper 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. Proc Natl Acad Sci USA 87(20): 7839-43.

Jerse, A. E. and J. B. Kaper 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by EAF plasmid. Infect Immun 59(12): 4302-09.

Johnson, J. R. and T. A. Russo 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E coli*". J Lab Clin Med 139(3): 155-62.

Jordan, D. M., N. Cornick, A. G. Torres, E. A. Dean-Nystrom, J. B. Kaper and H. W. Moon 2004. Long polar fimbriae contribute to colonization by *Escherichia coli* O157:H7 *in vivo*. Infect Immun 72(10): 6168-71.

Jordan, D. M., V. Sperandio, J. B. Kaper, E. A. Dean-Nystrom and H. W. Moon 2005. Colonization of gnotobiotic piglets by a *luxS* mutant strain of *Escherichia coli* O157:H7. Infect Immun 73(2): 1214-16.

Judge, N. A., H. S. Mason and A. D. O'Brien 2004. Plant cell-based intimin vaccine given orally to mice primed with intimin reduces time of *Escherichia coli* O157:H7 shedding in feces. Infect Immun 72(1): 168-75.

Kadokura, H., F. Katzen and J. Beckwith 2003. Protein disulfide bond formation in prokaryotes. Annu Rev Biochem 72: 111-35.

Kalman, D., O. D. Weiner, D. L. Goosney, J. W. Sedat, B. B. Finlay, A. Abo and J. M. Bishop 1999. Enteropathogenic *E. coli* acts through WASP and Arp2/3 complex to form actin pedestals. *Nat Cell Biol* **1**: 389-91.

Kanamaru, K., I. Tatsuno, T. Tobe and C. Sasakawa 2000. SdiA, an *Escherichia coli* homologue of quorum-sensing regulators, controls the expression of virulence factors in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol* **38**(4): 805-16.

Kang, G., A. B. Pulimood, R. Koshi, A. Hull, D. Acheson, P. Rajan, G. T. Keusch, V. I. Mathan and M. M. Mathan 2001. A monkey model for enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *J Infect Dis* **184**(2): 206-10.

Kaniga, K., I. Delor and G. R. Cornelis 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**(1): 137-41.

Kaper, J. B., T. K. McDaniel, K. G. Jarvis and O. Gomez-Duarte 1997. Genetics of virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **412**: 279-87.

Kaper, J. B., S. Elliott, V. Sperandio, N. T. Perna, G. F. Mayhew and F. R. Blattner 1998. Attaching and effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement in *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin-producing *E. coli* strains, Washington, DC, American Society for Microbiology.

Karpman, D., Z. D. Bekassy, A. C. Sjogren, M. S. Dubois, M. A. Karmali, M. Mascarenhas, K. G. Jarvis, L. J. Gansheroff, A. D. O'Brien, G. S. Arbus and J. B. Kaper 2002. Antibodies to intimin and *Escherichia coli* secreted proteins A and B in patients with enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections. *Pediatr Nephrol* **17**(3): 201-11.

Keller, R., J. G. Ordonez, R. R. de Oliveira, L. R. Trabulsi, T. J. Baldwin and S. Knutton 2002. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**(5): 2681-9.

Kelly, G., S. Prasannan, S. Daniell, G. Frankel, G. Dougan, I. Connerton and S. Matthews 1998. Sequential assignment of the triple labelled 30.1 kDa cell-adhesion domain of intimin from enteropathogenic *E. coli*. *J Biomol NMR* **12**(1): 189-91.

Kelly, G., S. Prasannan, S. Daniell, K. Fleming, G. Frankel, G. Dougan, I. Connerton and S. Matthews 1999. Structure of the cell-adhesion fragment of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**(4): 313-8.

Kenny, B., L.-C. Lai, B. B. Finlay and M. S. Donnenberg 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**: 313-23.

Kenny, B. and B. B. Finlay 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1. *Infect Immun* **65**(7): 2528-36.

Kenny, B., A. Abe, M. Stein and B. B. Finlay 1997a. Enteropathogenic *Escherichia coli* protein secretion is induced in response to conditions similar to those in the gastrointestinal tract. *Infect Immun* **65**(7): 2606-12.

Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey and B. B. Finlay 1997b. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**(4): 511-20.

Kenny, B. and M. Jepson 2000. Targeting of an enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) effector protein to host mitochondria. *Cell Microbiol* **2**(6): 579-90.

Kenny, B. 2001. The enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (serotype O157:H7) Tir molecule is not functionally interchangeable for its enteropathogenic *E. coli* (serotype O127:H6) homologue. *Cell Microbiol* **3**(8): 499-510.

Kenny, B., S. Ellis, A. D. Leard, J. Warawa, H. Mellor and M. A. Jepson 2002. Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic *Escherichia coli* effector molecules. *Mol Microbiol* **44**(4): 1095-1107.

Killian, M. and M. W. Russell 1994. Function of mucosal immunoglobulins. *Handbook of Mucosal Immunology*. P. L. Ogra, J. Mestecky, M. E. Lammet al. Orlando, FL, Academic Press: 127-37.

Klapproth, J. M., M. S. Sonnenberg, J. M. Abraham and S. P. James 1996. Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphokine production by gastrointestinal lymphocytes. *Am J Physiol* **271**(5 Pt 1): G841-8.

Klapproth, J. M., I. C. Scaletsky, B. P. McNamara, L. C. Lai, C. Malstrom, S. P. James and M. S. Sonnenberg 2000. A large toxin from pathogenic *Escherichia coli* strains that inhibits lymphocyte activation. *Infect Immun* **68**(4): 2148-55.

Knappstein, S., T. Ide, M. A. Schmidt and G. Heusipp 2004. Alpha 1-antitrypsin binds to and interferes with functionality of EspB from atypical and typical enteropathogenic *Escherichia coli* strains. *Infect Immun* **72**(8): 4344-50.

Knutton, S., D. R. Lloyd and A. S. McNeish 1987a. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun* **55**(1): 69-77.

Knutton, S., T. Baldini, J. B. Kapper and A. S. McNeish 1987b. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Infect Immun* 55: 78-85.

Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams and A. S. McNeish 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 57: 1290-98.

Knutton, S. 1994. Attaching and effacing *Escherichia coli*. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. C. L. Gyles. Wallingford, CAB International: 567-91.

Knutton, S., J. Adu-Bobie, C. Bain, A. D. Phillips, G. Dougan and G. Frankel 1997. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun* 65(5): 1644-52.

Knutton, S., I. Rosenshine, J. M. Pallen, I. Nisan, C. B. Neves, C. Bain, C. Wolff, G. Dougan and G. Frankel 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17(8): 2166-76.

Knutton, S., R. K. Shaw, R. P. Anantha, M. S. Sonnenberg and A. A. Zoragani 1999. The type IV bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* undergoes dramatic alterations in structure associated with bacterial adherence, aggregation and dispersal. *Mol Microbiol* 33(3): 499-509.

Koebnik, R., K. P. Locher and P. Van Gelder 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol* 37(2): 239-53.

Kovach, M. E., M. D. Shaffer and K. M. Peterson 1996. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **142**(Pt 8): 2165-74.

Kresse, A. U., M. Rohde and C. A. Guzman 1999. The EspD protein of enterohemorrhagic *Escherichia coli* is required for the formation of bacterial surface appendages and is incorporated in the cytoplasmic membranes of target cells. *Infect Immun* **67**(9): 4834-42.

Kresse, A. U., F. Beltrametti, A. Muller, F. Ebel and C. A. Guzman 2000. Characterization of SepL of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **182**(22): 6490-8.

Kweon, C. H., B. J. Kwon, S. R. Woo, J. M. Kim, G. H. Woo, D. H. Son, W. Hur and Y. S. Lee 2000. Immunoprophylactic effect of chicken egg yolk immunoglobulin (IgY) against porcine epidemic diarrhea virus (PEDV) in piglets. *J Vet Med Sci* **62**(9): 961-4.

Lai, L. C., L. A. Wainwright, K. D. Stone and M. S. Donnenberg 1997. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect Immun* **65**(6): 2211-7.

Larson, M. A., S. H. Wei, A. Weber, D. R. Mack and T. L. McDonald 2003. Human serum amyloid A3 peptide enhances intestinal MUC3 expression and inhibits EPEC adherence. *Biochem Biophys Res Commun* **300**(2): 531-40.

Law, D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **7**(2): 152-73.

LeClaire, R. D., R. E. Hunt and S. Bavari 2002. Protection against bacterial superantigen staphylococcal enterotoxin B by passive vaccination. *Infect Immun* **70**(5): 2278-81.

Ledger, T. N., P. Pinton, D. Bourges, P. Roumi, H. Salmon and I. P. Oswald 2004. Development of a macroarray to specifically analyze immunological gene expression in swine. *Clin Diagn Lab Immunol* **11**(4): 691-8.

Leverton, L. Q. and J. B. Kaper 2005. Temporal expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an *in vitro* model of infection. *Infect Immun* **73**(2): 1034-43.

Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements and A. D. O'Brien 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J Infect Dis* **152**(3): 550-9.

Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J Infect Dis* **155**(3): 377-89.

Li, Y., E. Frey, A. M. Mackenzie and B. B. Finlay 2000. Human response to *Escherichia coli* O157:H7 infection: antibodies to secreted virulence factors. *Infect Immun* **68**(9): 5090-5.

Liu, H., L. Magoun and J. M. Leong 1999. β_1 -chain integrins are not essential for intimin-mediated host cell attachment and enteropathogenic *Escherichia coli*-induced actin condensation. *Infect Immun* **67**(4): 2045-9.

Ludwig, K., M. Bitzan, C. Bobrowski and D. E. Muller-Wiefel 2002. *Escherichia coli* O157 fails to induce a long-lasting lipopolysaccharide-specific, measurable

humoral immune response in children with hemolytic-uremic syndrome. *J Infect Dis* **186**(4): 566-9.

Luo, Y., E. A. Frey, R. A. Pfuetzner, A. L. Creagh, D. G. Knoechel, C. A. Haynes, B. B. Finlay and N. C. Strynadka 2000. Crystal structure of enteropathogenic *Escherichia coli* intimin-receptor complex. *Nature* **405**(6790): 1073-7.

Luperchio, S. A. and D. B. Schauer 2001. Molecular pathogenesis of *Citrobacter rodentium* and transmissible murine colonic hyperplasia. *Microbes Infect* **3**(4): 333-40.

Ma, J., T. Chen, J. Mandelin, A. Ceponis, N. E. Miller, M. Hukkanen, G. F. Ma and Y. T. Konttinen 2003. Regulation of macrophage activation. *Cell Mol Life Sci* **60**(11): 2334-46.

Ma, W., K. Gee, W. Lim, K. Chambers, J. B. Angel, M. Kozlowski and A. Kumar 2004. Dexamethasone inhibits IL-12p40 production in lipopolysaccharide-stimulated human monocytic cells by down-regulating the activity of c-Jun N-terminal kinase, the activation protein-1, and NF-kappa B transcription factors. *J Immunol* **172**(1): 318-30.

Maaser, C., M. P. Housley, M. Iimura, J. R. Smith, B. A. Vallance, B. B. Finlay, J. R. Schreiber, N. M. Varki, M. F. Kagnoff and L. Eckmann 2004. Clearance of *Citrobacter rodentium* requires B cells but not secretory immunoglobulin A (IgA) or IgM antibodies. *Infect Immun* **72**(6): 3315-24.

MacDonald, T. T. and G. Monteleone 2001. IL-12 and Th1 immune responses in human Peyer's patches. *Trends Immunol* **22**(5): 244-7.

Malish, H. R., N. L. Freeman, D. V. Zurawski, P. Chowrashi, J. C. Ayoob, J. W. Sanger and J. M. Sanger 2003. Potential role of the EPEC translocated intimin receptor (Tir) in host apoptotic events. *Apoptosis* **8**(2): 179-90.

Malstrom, C. and S. James 1998. Inhibition of murine splenic and mucosal lymphocyte function by enteric bacterial products. *Infect Immun* **66**(7): 3120-27.

Manjarrez-Hernandez, H. A., T. J. Baldwin, P. H. Williams, R. Haigh, S. Knutton and A. Aitken 1996. Phosphorylation of myosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **64**(6): 2368-70.

Mansfield, K. G., K. C. Lin, D. Xia, J. V. Newman, D. B. Schauer, J. MacKey, A. A. Lackner and A. Carville 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* and ulcerative colitis in cotton-top tamarins (*Saguinus oedipus*). *J Infect Dis* **184**(6): 803-7.

Marches, O., J. P. Nougayrede, S. Boullier, J. Mainil, G. Charlier, I. Raymond, P. Pohl, M. Boury, J. De Rycke, A. Milon and E. Oswald 2000. Role of Tir and intimin in the virulence of rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* serotype O103:H2. *Infect Immun* **68**(4): 2171-82.

Marches, O., T. N. Ledger, M. Boury, M. Ohara, X. Tu, F. Goffaux, J. Mainil, I. Rosenshine, M. Sugai, J. De Rycke and E. Oswald 2003. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* deliver a novel effector called Cif, which blocks cell cycle G2/M transition. *Mol Microbiol* **50**(5): 1553-67.

Marquardt, R. R., L. Z. Jin, J. W. Kim, L. Fang, A. A. Frohlich and S. K. Baidoo 1999. Passive protective effect of egg-yolk antibodies against enterotoxigenic *Escherichia coli* K88+ infection in neonatal and early- weaned piglets. *FEMS Immunol Med Microbiol* **23**(4): 283-8.

Martinez, J. J. and S. J. Hultgren 2002. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**(1): 19-28.

Mavris, M. and P. Sansonetti 2004. Microbial-gut interactions in health and disease. Epithelial cell responses. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**(2): 373-86.

McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(5): 1664-8.

McDaniel, T. K. and J. B. Kaper 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**(2): 399-407.

McKee, M. L. and A. D. O'Brien 1996. Truncated enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O157:H7 intimin (EaeA) fusion proteins promote adherence of EHEC strains to HEp-2 cells. *Infect Immun* **64**(6): 2225-33.

McNamara, B. P. and M. S. Donnenberg 1998. A novel proline-rich protein, EspF, is secreted from enteropathogenic *Escherichia coli* via the type III export pathway. *FEMS Microbiol Lett* **166**(1): 71-8.

McNamara, B. P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S. Donnenberg and G. Hecht 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest* **107**(5): 621-9.

Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, B. Lehoux and J. M. Fairbrother 2003a. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**(1): 494-503.

Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels and J. M. Fairbrother 2003b. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**(1): 536-40.

Mellies, J. L., F. Navarro-Garcia, I. Okeke, J. Frederickson, J. P. Nataro and J. B. Kaper 2001. EspC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* **69**(1): 315-24.

Ménard, L. P. and J. D. Dubreuil 2002. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1): a new toxin with an old twist. *Crit Rev Microbiol* **28**(1): 43-60.

Michael, B., J. N. Smith, S. Swift, F. Heffron and B. M. Ahmer 2001. SdiA of *Salmonella enterica* is a LuxR homolog that detects mixed microbial communities. *J Bacteriol* **183**(19): 5733-42.

Michail, S. K., D. R. Halm and F. Abernathy 2003. Enteropathogenic *Escherichia coli*: stimulating neutrophil migration across a cultured intestinal epithelium without altering transepithelial conductance. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* **36**(2): 253-60.

Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine and R. A. Giannella 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun* **41**: 1340-51.

Mouslim, C., F. Hilbert, H. Huang and E. A. Groisman 2002. Conflicting needs for a *Salmonella* hypervirulence gene in host and non-host environments. *Mol Microbiol* **45**(4): 1019-27.

Moxley, R. A. and D. H. Francis 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun* **53**: 339-46.

Mundy, R., L. Petrovska, K. Smollett, N. Simpson, R. K. Wilson, J. Yu, X. Tu, I. Rosenshine, S. Clare, G. Dougan and G. Frankel 2004. Identification of a novel *Citrobacter rodentium* type III secreted protein, EspI, and roles of this and other secreted proteins in infection. *Infect Immun* **72**(4): 2288-2302.

Muza-Moons, M. M., A. Koutsouris and G. Hecht 2003. Disruption of cell polarity by enteropathogenic *Escherichia coli* enables basolateral membrane proteins to migrate apically and to potentiate physiological consequences. *Infect Immun* **71**(12): 7069-78.

Nabuurs, M. J. 1998. Weaning piglets as a model for studying pathophysiology of diarrhea. *Vet Q* **20 Suppl 3**: S42-5.

Nagano, K., E. K. Read, Y. Murakami, T. Masuda, T. Noguchi and F. Yoshimura 2005. Trimeric structure of major outer membrane proteins homologous to OmpA in *Porphyromonas gingivalis*. *J Bacteriol* **187**(3): 902-11.

Naka, Y., T. Aihara, Y. Keto and S. Okabe 2001. Effects of dexamethasone and FK506 on *Helicobacter pylori*-induced gastritis and bacterial viability in Mongolian gerbils. *J Physiol Paris* **95**(1-6): 443-51.

Nataro, J. P., I. C. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine and L. R. Trabulsi 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **48**(2): 378-83.

Nataro, J. P., K. O. Maher, P. Mackie and J. B. Kaper 1987. Characterization of plasmids encoding the adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**: 2370-77.

Nataro, J. P. and J. B. Kaper 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.

Nathan, C. and M. U. Shiloh 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**(16): 8841-8.

Nealson, K. H., T. Platt and J. W. Hastings 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**(1): 313-22.

Neish, A. S. 2002. The gut microflora and intestinal epithelial cells: a continuing dialogue. *Microbes Infect* **4**(3): 309-17.

Neutra, M. R., A. Frey and J. P. Kraehenbuhl 1996. Epithelial M cells: Gateways for mucosal infection and immunization. *Cell* **86**(August): 345-8.

Neves, B. C., S. Knutton, L. R. Trabulsi, V. Sperandio, J. B. Kaper, G. Dougan and G. Frankel 1998. Molecular and ultrastructural characterisation of EspA from different enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 73-80.

Neves, B. C., R. K. Shaw, G. Frankel and S. Knutton 2003. Polymorphisms within EspA filaments of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(4): 2262-5.

Newman, J. V., B. A. Zabel, S. S. Jha and D. B. Schauer 1999. *Citrobacter rodentium espB* is necessary for signal transduction and for infection of laboratory mice. *Infect Immun* **67**(11): 6019-25.

Newton, H. J., J. Sloan, V. Bennett-Wood, L. M. Adams, R. M. Robins-Browne and E. L. Hartland 2004. Contribution of long polar fimbriae to the virulence of rabbit-specific enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**(3): 1230-39.

Ngeleka, M. 2002. Isolation of a new *Escherichia coli* pathotype associated with diarrhea in piglets. *Can Vet J* **43**(8): 623-4.

Nicholls, L., T. H. Grant and R. M. Robins-Browne 2000. Identification of a novel genetic locus that is required for *in vitro* adhesion of a clinical isolate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* to epithelial cells. *Mol Microbiol* **35**(2): 275-88.

Nieman, L. K. 2002. Diagnostic tests for Cushing's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* **970**: 112-8.

Nougayrède, J.-P., O. Marchès, M. Boury, J. Mainil, G. Charlier, P. Pohl, J. De Rycke, A. Milon and E. Oswald 1999. The long-term cytoskeletal rearrangement induced by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli* is Esp dependent but intimin independent. *Mol Microbiol* **31**(1): 19-30.

Nougayrede, J. P., P. J. Fernandes and M. S. Donnenberg 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol* **5**(6): 359-72.

O'Brien, A. O., T. A. Lively, M. E. Chen, S. W. Rothman and S. B. Formal 1983. *Escherichia coli* O157:H7 strains associated with haemorrhagic colitis in the United States produce a *Shigella dysenteriae* 1 (SHIGA) like cytotoxin. *Lancet* **1**(8326 Pt 1): 702.

Ochoa, T. J., M. Noguera-Obenza, F. Ebel, C. A. Guzman, H. F. Gomez and T. G. Cleary 2003. Lactoferrin impairs type III secretory system function in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **71**(9): 5149-55.

Ochoa-Reparaz, J., B. Sesma, M. Alvarez, M. Jesus Renedo, J. M. Irache and C. Gamazo 2004. Humoral immune response in hens naturally infected with *Salmonella Enteritidis* against outer membrane proteins and other surface structural antigens. *Vet Res* **35**(3): 291-8.

Ohnishi, M., K. Kurokawa and T. Hayashi 2001. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? Trends Microbiol **9**(10): 481-5.

Orrick, L. R., M. O. Olson and H. Busch 1973. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. Proc Natl Acad Sci USA **70**(13):16-20).

Orskov, F. and I. Orskov 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. Methods Microbiol **14**: 43-112.

Orskov, F. and I. Orskov 1992. *Escherichia coli* serotyping and disease in man and animals. Can J Microbiol **38**: 699-704.

Oswald, E., H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marches and A. Caprioli 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. Infect Immun **68**(1): 64-71.

Oswald, I. P., C. M. Dozois, R. Barlagne, S. Fournout, M. V. Johansen and H. O. Bøgh 2001. Cytokine mRNA expression in pigs infected with *Schistosoma japonicum*. Parasitology **122**(Pt 3): 299-307.

Ottonello, G. A. and A. Primavera 1979. Gastrointestinal complication of high-dose corticosteroid therapy in acute cerebrovascular patients. Stroke **10**(2): 208-10.

Pampusch, M. S., A. M. Bennaars, S. Harsch and M. P. Murtaugh 1998. Inducible nitric oxide synthase expression in porcine immune cells. Vet Immunol Immunopathol **61**(2-4): 279-89.

Parissi-Crivelli, A., J. M. Parissi-Crivelli and J. A. Giron 2000. Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. *J Clin Microbiol* **38**(7): 2696-2700.

Perna, N. T., G. F. Mayhew, G. Posfai, S. Elliott, M. S. Donnenberg, J. B. Kaper and F. R. Blattner 1998. Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **66**(8): 3810-7.

Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch and F. R. Blattner 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**(6819): 529-33.

Peterson, K. M. and J. J. Mekalanos 1988. Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect Immun* **56**(11): 2822-9.

Phillips, A. D. and G. Frankel 2000. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human intestinal organ cultures. *J Infect Dis* **181**(4): 1496-500.

Phillips, A. D., J. Giron, S. Hicks, G. Dougan and G. Frankel 2000a. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* mediates remodelling of the eukaryotic cell surface. *Microbiology* **146**(Pt 6): 1333-44.

Phillips, A. D., S. Navabpour, S. Hicks, G. Dougan, T. Wallis and G. Frankel 2000b. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 target Peyer's patches in humans and cause attaching/effacing lesions in both human and bovine intestine. *Gut* **47**(3): 377-81.

Pie, S., J. P. Lalles, F. Blazy, J. Laffitte, B. Seve and I. P. Oswald 2004. Weaning is associated with an upregulation of expression of inflammatory cytokines in the intestine of piglets. *J Nutr* **134**(3): 641-7.

Piva, A., P. Anfossi, E. Meola, A. Pietri, A. Panciroli, T. Bertuzzi and A. Formigoni 1997. Effect of microcapsulation on absorption processes in the pig. *Livestock Production Science* **51**: 53-61.

Plotkowski, M. C., A. O. Costa, V. Morandi, H. S. Barbosa, H. B. Nader, S. de Bentzmann and E. Puchelle 2001. Role of heparan sulphate proteoglycans as potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. *J Med Microbiol* **50**(2): 183-90.

Pohl, P. H., J. E. Peeters, E. R. Jacquemin, P. F. Lintermans and J. G. Mainil 1993. Identification of *eae* sequences in enteropathogenic *Escherichia coli* strain from rabbits. *Infect Immun* **61**: 2203-6.

Polotsky, Y., E. Dragunsky and T. Khavkin 1994. Morphologic evaluation of the pathogenesis of bacterial enteric infections. *Crit Rev Microbiol* **20**: 161-208.

Pospischil, A., J. G. Mainil, G. Baljer and H. W. Moon 1987. Attaching and effacing bacteria in the intestines of calves and cats with diarrhea. *Vet Pathol* **24**: 330-4.

Potter, A. A., S. Klashinsky, Y. Li, E. Frey, H. Townsend, D. Rogan, G. Erickson, S. Hinkley, T. Klopfenstein, R. A. Moxley, D. R. Smith and B. B. Finlay 2004. Decreased shedding of *Escherichia coli* O157:H7 by cattle following vaccination with type III secreted proteins. *Vaccine* **22**(3-4): 362-9.

Pritts, T., E. Hungness, Q. Wang, B. Robb, D. Hershko and P. O. Hasselgren 2002. Mucosal and enterocyte IL-6 production during sepsis and endotoxemia--role

of transcription factors and regulation by the stress response. *Am J Surg* **183**(4): 372-83.

Ramachandran, V., K. Brett, M. A. Hornitzky, M. Dowton, K. A. Bettelheim, M. J. Walker and S. P. Djordjevic 2003. Distribution of intimin subtypes among *Escherichia coli* isolates from ruminant and human sources. *J Clin Microbiol* **41**(11): 5022-32.

Ramana, C. V., M. Chatterjee-Kishore, H. Nguyen and G. R. Stark 2000. Complex roles of Stat1 in regulating gene expression. *Oncogene* **19**(21): 2619-27.

Ramirez, K., R. Huerta, E. Oswald, C. Garcia-Tovar, J. M. Hernandez and F. Navarro-Garcia 2005. Role of EspA and intimin in expression of proinflammatory cytokines from enterocytes and lymphocytes by rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*-infected rabbits. *Infect Immun* **73**(1): 103-13.

Reece, S., C. P. Simmons, R. J. Fitzhenry, S. Matthews, A. D. Phillips, G. Dougan and G. Frankel 2001. Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity. *Mol Microbiol* **40**(1): 86-98.

Reece, S., C. P. Simmons, R. J. Fitzhenry, M. Ghaem-Maghami, R. Mundy, C. Hale, S. Matthews, G. Dougan, A. D. Phillips and G. Frankel 2002. Tyrosine residues at the immunoglobulin-C-type lectin inter-domain boundary of intimin are not involved in Tir-binding but implicated in colonisation of the host. *Microbes Infect* **4**(14): 1389-99.

Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgersen, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake and M. L. Cohen 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N Engl J Med* **308**(12): 681-5.

Roberts, R. F. and W. L. Roberts 2004. Performance characteristics of five automated serum cortisol immunoassays. *Clin Biochem* **37**(6): 489-93.

Rogler, G. and T. Andus 1998. Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* **22**(4): 382-9.

Rosenshine, I., M. S. Donnenberg, J. B. Kaper and B. B. Finlay 1992a. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *Embo J* **11**(10): 3551-60.

Rosenshine, I., V. Duronio and B. B. Finlay 1992b. Tyrosine protein kinase inhibitors block invasin-promoted bacterial uptake by epithelial cells. *Infect Immun* **60**: 2211-17.

Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. J. Reinscheid, S. D. Mills and B. B. Finlay 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J* **15**(11): 2613-24.

Rostand, K. S. and J. D. Esko 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect Immun* **65**(1): 1-8.

Roy, M. J. and T. J. Walsh 1992. Histopathologic and immunohistochemical changes in gut-associated lymphoid tissues after treatment of rabbits with dexamethasone. *Lab Invest* **66**(4): 437-43.

Saklatvala, J. 2002. Glucocorticoids: do we know how they work? *Arthritis Res* **4**(3): 146-50.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. New York.

Savkovic, S. D., A. Koutsouris and G. Hecht 1996. Attachment of a noninvasive enteric pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. Infect Immun **64**(11): 4480-7.

Savkovic, S. D., A. Koutsouris and G. Hecht 1997. Activation of NF-kappa B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. Am J Physiol Cell Physiol **273**(4): C1160-7.

Schauer, D. B. and S. Falkow 1993a. Attaching and effacing locus of a *Citrobacter freundii* biotype that causes transmissible murine colonic hyperplasia. Infect Immun **61**(6): 2486-92.

Schauer, D. B. and S. Falkow 1993b. The *eae* gene of *Citrobacter freundii* biotype 4280 is necessary for colonization in transmissible murine colonic hyperplasia. Infect Immun **61**(11): 4654-61.

Schmaldienst, S. and W. H. Horl 1996. Bacterial infections during immunosuppression - immunosuppressive agents interfere not only with immune response, but also with polymorphonuclear cell function. Nephrol Dial Transplant **11**(7): 1243-5.

Sharma, J. M. 1997. The structure and function of the avian immune system. Acta Vet Hung **45**(3): 229-38.

Sharma, J. M. 1999. Introduction to poultry vaccines and immunity. Adv Vet Med **41**: 481-94.

Shaw, R. K., S. Daniell, G. Frankel and S. Knutton 2002. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocate Tir and form an intimin-Tir intimate attachment to red blood cell membranes. *Microbiology* **148**(5): 1355-65.

Shaw, R. K., J. Cleary, M. S. Murphy, G. Frankel and S. Knutton 2005. Interaction of enteropathogenic *Escherichia coli* with human intestinal mucosa: role of effector proteins in brush border remodeling and formation of attaching and effacing lesions. *Infect Immun* **73**(2): 1243-51.

Sherman, P., R. Soni and M. Karmali 1988. Attaching and effacing adherence of vero cytotoxin-producing *Escherichia coli* to rabbit intestinal epithelium *in vivo*. *Infect Immun* **56**(4): 756-61.

Shin, J. H., M. Yang, S. W. Nam, J. T. Kim, N. H. Myung, W. G. Bang and I. H. Roe 2002. Use of egg yolk-derived immunoglobulin as an alternative to antibiotic treatment for control of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Diagn Lab Immunol* **9**(5): 1061-6.

Shtrichman, R. and C. E. Samuel 2001. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr Opin Microbiol* **4**(3): 251-9.

Simmons, C. P., N. S. Goncalves, M. Ghaem-Maghami, M. Bajaj-Elliott, S. Clare, B. Neves, G. Frankel, G. Dougan and T. T. MacDonald 2002. Impaired resistance and enhanced pathology during infection with a noninvasive, attaching-effacing enteric bacterial pathogen, *Citrobacter rodentium*, in mice lacking IL-12 or IFN-gamma. *J Immunol* **168**(4): 1804-12.

Simmons, C. P., S. Clare, M. Ghaem-Maghami, T. K. Uren, J. Rankin, A. Huett, R. Goldin, D. J. Lewis, T. T. MacDonald, R. A. Strugnell, G. Frankel and G. Dougan 2003. Central role for B lymphocytes and CD4⁺ T cells in immunity to

infection by the attaching and effacing pathogen *Citrobacter rodentium*. Infect Immun **71**(9): 5077-86.

Sinclair, J. F. and A. D. O'Brien 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Biol Chem **277**(4): 2876-85.

Sinclair, J. F. and A. D. O'Brien 2004. Intimin types alpha, beta, and gamma bind to nucleolin with equivalent affinity but lower avidity than to the translocated intimin receptor. J Biol Chem **279**(32): 33751-8.

Singh, S. P., Y. U. Williams, S. Miller and H. Nikaido 2003. The C-terminal domain of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium OmpA is an immunodominant antigen in mice but appears to be only partially exposed on the bacterial cell surface. Infect Immun **71**(7): 3937-46.

Smith, D. J., W. F. King and R. Godiska 2001. Passive transfer of immunoglobulin Y antibody to *Streptococcus mutans* glucan binding protein B can confer protection against experimental dental caries. Infect Immun **69**(5): 3135-42.

Smith, H. 1992. Virulence determinants of *Escherichia coli*: present knowledge and questions. Can J Microbiol **38**: 747-52.

Sohel, I., J. L. Puente, W. J. Murray, J. Vuopio-Varkila and G. K. Schoolnik 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. Mol Microbiol **7**(4): 563-75.

Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C. Y. Wu and G. K. Schoolnik 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of a gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. J Bacteriol **178**(9): 2613-28.

Sorokina, E. A. and J. G. Kleinman 1999. Cloning and preliminary characterization of a calcium-binding protein closely related to nucleolin on the apical surface of inner medullary collecting duct cells. *J Biol Chem* **274**: 27491-96.

Spahn, T. W. and T. Kucharzik 2004. Modulating the intestinal immune system: the role of lymphotoxin and GALT organs. *Gut* **53**(3): 456-65.

Sperandio, V., J. A. Giron, W. D. Silveira and J. B. Kaper 1995. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun* **63**(11): 4433-8.

Sperandio, V., J. B. Kaper, M. R. Bortolini, B. C. Neves, R. Keller and L. R. Trabulsi 1998. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. *FEMS Microbiol Lett* **164**(1): 133-9.

Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin and J. B. Kaper 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(26): 15196-201.

Sperandio, V., A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro and J. B. Kaper 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* **100**(15): 8951-6.

Splichal, I., I. Trebichavsky, Y. Muneta and Y. Mori 2002. Early cytokine response of gnotobiotic piglets to *Salmonella enterica* serotype Typhimurium. *Vet Res* **33**(3): 291-7.

Stadnyk, A. W., G. R. Sisson and C. C. Waterhouse 1995. IL-1 alpha is constitutively expressed in the rat intestinal epithelial cell line IEC-6. *Exp Cell Res* **220**(2): 298-303.

Stagg, A. J., A. L. Hart, S. C. Knight and M. A. Kamm 2003. The dendritic cell: its role in intestinal inflammation and relationship with gut bacteria. *Gut* **52**(10): 1522-9.

Staley, T. E., E. W. Jones and L. D. Corley 1969. Attaching and penetration of *Escherichia coli* into intestinal epithelium in newborn piglets. *Am J Pathol* **56**: 371-92.

Stein, M., B. Kenny, M. A. Stein and B. B. Finlay 1996. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol* **178**(22): 6546-54.

Stender, S., A. Friebe, S. Linder, M. Rohde, S. Mirolid and W. D. Hardt 2000. Identification of SopE2 from *Salmonella typhimurium*, a conserved guanine nucleotide exchange factor for Cdc42 of the host cell. *Mol Microbiol* **36**(6): 1206-21.

Stevens, M. P., P. M. van Diemen, G. Frankel, A. D. Phillips and T. S. Wallis 2002. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect Immun* **70**(9): 5158-66.

Stevens, M. P., A. J. Roe, I. Vlisidou, P. M. van Diemen, R. M. La Ragione, A. Best, M. J. Woodward, D. L. Gally and T. S. Wallis 2004. Mutation of *toxB* and a truncated version of the *efa-1* gene in *Escherichia coli* O157:H7 influences the expression and secretion of locus of enterocyte effacement-encoded proteins but not intestinal colonization in calves or sheep. *Infect Immun* **72**(9): 5402-11.

Stoffregen, W. C., J. F. Pohlenz and E. A. Dean-Nystrom 2004. *Escherichia coli* O157:H7 in the gallbladders of experimentally infected calves. J Vet Diagn Invest **16**(1): 79-83.

Stokes, C. R., M. Bailey and A. D. Wilson 1994. Immunology of the porcine gastrointestinal tract. Vet Immunol Immunopathol **43**(1-3): 143-50.

Stokes, C. R. and M. Bailey 2000. The porcine gastrointestinal lamina propria: an appropriate target for mucosal immunisation? J Biotechnol **83**(1-2): 51-5.

Stone, K. D., H. Z. Zhang, L. K. Carlson and M. S. Donnenberg 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the biogenesis of a type IV pilus. Mol Microbiol **20**(2): 325-37.

Suarez, P. 2000. Ultrastructural pathogenesis of the PRRS virus. Vet Res **31**(1): 47-55.

Sueyoshi, M., M. Nakazawa and S. Tanaka 1997. A chick model for the study of "attaching and effacing *Escherichia coli*" infection. Adv Exp Med Biol **412**: 99-102.

Surette, M. G., M. B. Miller and B. L. Bassler 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. Proc Natl Acad Sci USA **96**(4): 1639-44.

Sussman, M. 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease. The virulence of *Escherichia coli*: reviews and methods. M. Sussman. London, Academic Press, Inc. Ltd.: 7-45.

Tacket, C. O., M. B. Sztein, G. Losonsky, A. Abe, B. B. Finlay, B. P. McNamara, G. T. Fantry, S. P. James, J. P. Nataro, M. M. Levine and M. S. Donnenberg

2000. Role of EspB in experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* **68**(6): 3689-95.

Takeuchi, A., L. R. Inman, P. D. O'Hanley, J. R. Cantey and W. B. Lushbaugh 1978. Scanning and transmission electron microscopic study of *Escherichia coli* O15 (RDEC-1) enteric infection in rabbits. *Infect Immun* **19**(2): 686-94.

Tanaka, H., N. Toyoda, E. Adachi and T. Takeda 2000. Immunologic evaluation of an *Escherichia coli* O157-infected pregnant woman. A case report. *J Reprod Med* **45**(5): 442-4.

Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor and T. E. Besser 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**(3): 1400-7.

Tatsuno, I., H. Kimura, A. Okutani, K. Kanamaru, H. Abe, S. Nagai, K. Makino, H. Shinagawa, M. Yoshida, K. Sato, J. Nakamoto, T. Tobe and C. Sasakawa 2000. Isolation and characterization of mini-Tn5Km2 insertion mutants of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 deficient in adherence to caco-2 cells. *Infect Immun* **68**(10): 5943-52.

Tatsuno, I., M. Horie, H. Abe, T. Miki, K. Makino, H. Shinagawa, H. Taguchi, S. Kamiya, T. Hayashi and C. Sasakawa 2001. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. *Infect Immun* **69**(11): 6660-9.

Taylor, K. A., C. B. O'Connell, P. W. Luther and M. S. Sonnenberg 1998. The EsB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. *Infect Immun* **66**(11): 5501-07.

Taylor, K. A., P. W. Luthier and M. S. Donnenberg 1999. Expression of the *espB* protein of enteropathogenic *Escherichia coli* within HeLa cells affects stress fibers and cellular morphology. *Infect Immun* **67**(1): 120-5.

Taylor, K. A., C. B. O'Connell, R. Thompson and M. S. Donnenberg 2001. The role of pyridoxal phosphate in the function of EspB, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett* **488**(1-2): 55-8.

Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong and J. J. Mekalanos 1987. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(9): 2833-7.

Tobe, T., G. K. Schoolnik, I. Sohel, V. H. Bustamante and J. L. Puente 1996. Cloning and characterization of *bfpTVW* genes required for the transcriptional activation of *bfpA* in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **21**(5): 963-75.

Tobe, T., I. Tatsuno, E. Katayama, C.-Y. Wu, G. K. Schoolnik and C. Sasakawa 1999. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol Microbiol* **33**(4): 741-52.

Torres, A. G., J. A. Giron, N. T. Perna, V. Burland, F. R. Blattner, F. Avelino-Flores and J. B. Kaper 2002. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun* **70**(10): 5416-27.

Torres, A. G. and J. B. Kaper 2003. Multiple elements controlling adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *Infect Immun* **71**(9): 4985-95.

Torres, A. G., K. J. Kanack, C. B. Tutt, V. Popov and J. B. Kaper 2004. Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett* **238**(2): 333-44.

Touze, T., R. D. Hayward, J. Eswaran, J. M. Leong and V. Koronakis 2004. Self-association of EPEC intimin mediated by the beta-barrel-containing anchor domain: a role in clustering of the Tir receptor. *Mol Microbiol* **51**(1): 73-87.

Tsitoura, D. C. and P. B. Rothman 2004. Enhancement of MEK/ERK signaling promotes glucocorticoid resistance in CD4+ T cells. *J Clin Invest* **113**(4): 619-27.

Tsutsumi, R., N. Ichinohe, O. Shimooki, F. Obata, K. Takahashi, K. Inada, M. Sasaki, S. Sato and S. Chida 2004. Homologous and heterologous antibody responses to lipopolysaccharide after enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Microbiol Immunol* **48**(1): 27-38.

Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski and I. Rosenshine 2003. EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **47**(3): 595-606.

Tzipori, S., R. M. Robins-Browne, G. Gonis, J. Hayes, M. Withers and E. McCartney 1985. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut* **26**(6): 570-8.

Tzipori, S., I. K. Wachsmuth, C. Chapman, R. Birden, J. Brittingham, C. Jackson and J. Hogg 1986. The pathogenesis of hemorrhagic colitis caused by *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *J Infect Dis* **154**(4): 712-6.

Tzipori, S., H. Karch, K. I. Wachsmuth, R. M. Robins-Browne, A. D. O'Brien, H. Lior, M. L. Cohen, J. Smithers and M. M. Levine 1987. Role of a 60-

megadalton plasmid and Shiga-like toxins in the pathogenesis of infection caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in gnotobiotic piglets. *Infect Immun* 55(12): 3117-25.

Tzipori, S., R. Gibson and J. Montanaro 1989. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. *Infect Immun* 57(4): 1142-50.

Tzipori, S., F. Gunzer, M. S. Sonnenberg, L. de Montigny, J. B. Kaper and A. Donohue-Rolfe 1995. The role of the *eaeA* gene in diarrhea and neurological complications in a gnotobiotic piglet model of enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 63(9): 3621-7.

Vallance, B. A., W. Deng, L. A. Knodler and B. B. Finlay 2002a. Mice lacking T and B lymphocytes develop transient colitis and crypt hyperplasia yet suffer impaired bacterial clearance during *Citrobacter rodentium* infection. *Infect Immun* 70(4): 2070-81.

Vallance, B. A., W. Deng, M. De Grado, C. Chan, K. Jacobson and B. B. Finlay 2002b. Modulation of inducible nitric oxide synthase expression by the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium* in infected mice. *Infect Immun* 70(11): 6424-35.

Vallance, B. A., W. Deng, K. Jacobson and B. B. Finlay 2003. Host susceptibility to the attaching and effacing bacterial pathogen *Citrobacter rodentium*. *Infect Immun* 71(6): 3443-53.

van de Kar, N. C., L. A. Monnens, M. A. Karmali and V. W. van Hinsbergh 1992. Tumor necrosis factor and interleukin-1 induce expression of the verocytotoxin receptor globotriaosylceramide on human endothelial cells: implications for the pathogenesis of the hemolytic uremic syndrome. *Blood* 80(11): 2755-64.

van Woensel, J. B., R. Lutter, M. H. Biezeveld, T. Dekker, M. Nijhuis, W. M. van Aalderen and T. W. Kuijpers 2003. Effect of dexamethasone on tracheal viral load and interleukin-8 tracheal concentration in children with respiratory syncytial virus infection. *Pediatr Infect Dis J* **22**(8): 721-6.

Vlisidou, I., M. Lyte, P. M. van Diemen, P. Hawes, P. Monaghan, T. S. Wallis and M. P. Stevens 2004. The neuroendocrine stress hormone norepinephrine augments *Escherichia coli* O157:H7-induced enteritis and adherence in a bovine ligated ileal loop model of infection. *Infect Immun* **72**(9): 5446-51.

von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic acid research* **14**: 4683-90.

Wainwright, L. A. and J. B. Kaper 1998. EspB and EspD require a specific chaperone for proper secretion from enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **27**(6): 1247-60.

Wang, X. D., P. A. de Boer and L. I. Rothfield 1991. A factor that positively regulates cell division by activating transcription of the major cluster of essential cell division genes of *Escherichia coli*. *Embo J* **10**(11): 3363-72.

Warawa, J., B. B. Finlay and B. Kenny 1999. Type III secretion-dependent hemolytic activity of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**(10): 5538-40.

Weis, W. I. and K. Drickamer 1996. Structural basis of lectin-carbohydrate recognition. *Annu Rev Biochem* **65**: 441-73.

Wills, R. W., J. T. Gray, P. J. Fedorka-Cray, K. J. Yoon, S. Ladely and J. J. Zimmerman 2000. Synergism between porcine reproductive and respiratory

syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis* in swine. *Vet Microbiol* **71**(3-4): 177-92.

Wolff, C., I. Nisan, E. Hanski, G. Frankel and I. Rosenshine 1998. Protein translocation into host epithelial cells by infecting enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**(1): 143-55.

www.jefo.ca/jefagro/technology.html 2005.

Yuhan, R., A. Koutsouris, S. D. Savkovic and G. Hecht 1997. Enteropathogenic *Escherichia coli*-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology* **113**(6): 1873-82.

Zhou, G., M. L. Seibenhener and M. W. Wooten 1997. Nucleolin is a protein kinase C-zeta substrate. Connection between cell surface signaling and nucleus in PC12 cells. *J Biol Chem* **272**: 31130-37.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Donnenberg, M. Beaudry and J. M. Fairbrother 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**(10): 4153-9.

Zhu, C., J. Harel, F. Dumas and J. M. Fairbrother 1995a. Identification of EaeA protein in the outer membrane of attaching and effacing *Escherichia coli* O45 from pigs. *FEMS Microbiol Lett* **129**: 237-42.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1995b. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* **59**(2): 118-23.

Zhu, C. 1996. Phenotypic and genotypic characterization of attaching and effacing *Escherichia coli* from pigs. Département de microbiologie et immunologie, Faculté de Médecine. Montréal, Université de Montréal. 140 pages.

Zhu, C., S. Ménard, J. D. Dubreuil and J. M. Fairbrother 1996. Detection and localization of the EaeA protein of attaching and effacing *Escherichia coli* O45 from pigs using a monoclonal antibody. *Microbial Pathog* **21**: 205-13.

Zobiack, N., U. Rescher, S. Laarmann, S. Michgehl, M. A. Schmidt and V. Gerke 2002. Cell-surface attachment of pedestal-forming enteropathogenic *E. coli* induces a clustering of raft components and a recruitment of annexin 2. *J Cell Sci* **115**(Pt 1): 91-8.

ANNEXES

ARTICLE 4

Characterization of the Novel Factor Paa Involved in the Early Steps of the Attaching and Effacing *Escherichia coli* Mechanism.

Isabelle Batisson, Marie-Pierre Guimond, Francis Girard, Hongyan An, Chengru Zhu, Eric Oswald, John M. Fairbrother, Mario Jacques and Josée Harel (2003).

Infection and Immunity 71(8): 4516-25

Characterization of the novel factor Paa involved in the early steps of the attaching and effacing *Escherichia coli* mechanism.

Isabelle Batisson¹⁻², Marie-Pierre Guimond², Francis Girard², Hongyan An³, Chengru Zhu⁴, Eric Oswald⁵, John M. Fairbrother², Mario Jacques² and Josée Harel^{2*}

¹Laboratoire de Biologie des Protistes, UMR 6023, Université Blaise Pascal, Clermont-II, Aubière, France. ²Groupe de Recherche sur les Maladies Infectieuses du Porc, Université de Montréal, Faculté de Médecine Vétérinaire, C. P. 5000, Saint-Hyacinthe, Québec J2S 7C6, Canada. ³Advantage International USA, Inc, Westport, CT 06880. ⁴Center for Vaccine Development, Division of Geographic Medicine, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, MD USA 21201. ⁵Unité INRA-ENVT de Microbiologie Moléculaire, École Vétérinaire de Toulouse, 31076 Toulouse Cedex, France.

*Corresponding author: josee.harel@umontreal.ca

Running title: Paa, a novel factor involved in adhesion mechanism of AEEC.

Keywords: Porcine A/E *E. coli*, *TnphoA* mutagenesis, *in vitro* ileal explant, *paa* (porcine A/E associated gene).

ABSTRACT

Non-enterotoxigenic porcine *E. coli* strains belonging to the serogroup O45 have been associated with postweaning diarrhea in swine and adhere to intestinal epithelial cells in a characteristic attaching and effacing (A/E) pattern. O45 porcine enteropathogenic *E. coli* (PEPEC) strain 86-1390 induces typical A/E lesions in a pig ileal explant model. Using *TnphoA* transposon insertion mutagenesis on strain 86-1390, we found a mutant that did not induce A/E lesions. The insertion was identified in a gene designated *paa* (porcine attaching-effacing associated gene). Sequence analysis of *paa* revealed an open reading frame of 753 bp encoding a 27.6 kDa protein which displayed 100%, 51.8% and 49% homology with Paa of EHEC O157:H7 (EDL933 and Sakai), PEB3 of *Campylobacter jejuni* and AcfC of *Vibrio cholerae*, respectively. Chromosomal localization studies indicated that the region containing *paa* was inserted between the *yciD* and *yciE* genes at about 28.3 min. of the *E. coli* K12 chromosome. The presence of *paa* and *eae* sequences in the porcine O45 strain is highly correlated with the A/E phenotype. However, the observation that three *eae*-positive but *paa*-negative PEPEC O45 strains were A/E negative provides further evidence for the importance of the *paa* gene in the A/E activity of O45 strains. As well, the complementation of the *paa* mutant restored A/E activity of the 86-1390 strain showing the involvement of Paa in PEPEC pathogenicity. These observations suggest that Paa contributes to the early stages of AEEC virulence.

INTRODUCTION

Attaching and effacing *E. coli* (AEEC) induces distinctive histopathological lesions on the intestinal mucosa, known as the attaching and effacing (A/E) lesions. These lesions are characteristic of enteric pathogens such as enteropathogenic *E. coli* (EPEC) responsible for severe childhood diarrhea in developing countries (Fagundes-Neto 1996; Nataro et Kaper 1998), enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) causing hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS), a diarrheagenic *E. coli* strain of rabbits (RDEC-1), strains of *Hafnia alvei* isolated from children with diarrhea and *Citrobacter rodentium* causing transmissible colonic hyperplasia in mice (Francis *et al.* 1986; Tzipori *et al.* 1989; Baldwin *et al.* 1991). A/E lesions have also been associated with diarrhea in different animal species such as rabbits, calves, dogs, cats, lambs, pigs and Tamarins (Cantey et Blake 1977; Moxley et Francis 1986; Broes *et al.* 1988; Janke *et al.* 1989; Zhu *et al.* 1994; Mansfield *et al.* 2001).

A/E lesions result from intimate bacterial adherence to the apical surface of enterocytes and activation of several chromosomal gene products that interact with components of the host cell, leading to host cell protein phosphorylation, effacement of target brush borders and disruption of the underlying actin cytoskeleton (Donnenberg et Kaper 1992; Nataro et Kaper 1998). These genes are clustered in a chromosomal pathogenicity island called the locus of enterocyte effacement (LEE). Its location and size vary in different strains. In EPEC strain E2348/69 and EHEC O157:H7 strains, the LEE is inserted in the *selC* locus at about 82 minutes on the *E. coli* K12 chromosome but its size varies from 35 kb for EPEC to 43 kb for EHEC. In strains of serotype O26:H-, the LEE is about 35 kb and is inserted in the *pheU* gene (McDaniel et Kaper 1997; Elliott *et al.* 1998; Sperandio *et al.* 1998). One of the LEE genes (*eae*) encodes intimin, a 94 kDa outer membrane protein involved in intimate attachment to host cells (Jerse *et al.* 1990). Another encodes a translocated intimin receptor called Tir which interacts with intimin and allows the intimate attachment of the bacteria to the epithelial cells (Kenny *et al.* 1997b). Other genes encode the secreted proteins EspA, EspB, EspD and EspF, which are responsible for signal transduction in epithelial cells (Knutton *et al.* 1987b; Foubister *et al.* 1994b; Jarvis *et*

al. 1995; McDaniel *et al.* 1995; Kenny *et al.* 1996; Lai *et al.* 1997; Taylor *et al.* 1998; McNamara *et al.* 2001) and are secreted through a type III secretion apparatus, the latter also being encoded in the LEE (McDaniel *et al.* 1995). The recently identified EspC enterotoxin located within a second pathogenicity island at 60 min. on the chromosome of *E. coli* may also play a role as an accessory virulence factor in some EPEC (Mellies *et al.* 2001).

A/E lesions in naturally occurring swine post-weaning diarrhea cases are often associated with *E. coli* of the O45 serogroup (Harel *et al.* 1991; Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1994). These pig AEEC, termed PEPEC, possess all the genes encoded by the LEE. The A/E activity of PEPEC O45 isolates is highly correlated with the presence of the LEE (Hélie *et al.* 1991; Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b). Although there is some heterogeneity in PEPEC strains with respect to the LEE insertion, all of these strains possess a β -intimin subtype. In PEPEC strain 86-1390, sequences of the *eae*, *tir* and *esp* regions are closely related to those of other AEEC, particularly of rabbit EPEC (REPEC) strains (An *et al.* 2000). The presence of the *eae* β variant gene in the porcine O45 strain 86-1390 (Zhu *et al.* 1996) is associated with the ability of this strain to produce A/E lesions in experimentally inoculated newborn gnotobiotic piglets (Zhu *et al.* 1994) and in an homologous *in vitro* model using newborn piglet ileal explants (Zhu *et al.* 1995b). We have created a bank of *TnphoA* mutants in PEPEC strain 86-1390 and screened for the loss of their capacity to induce the typical histopathological A/E lesions in pig intestinal ileal explants (An *et al.* 1999a). One mutant, M155, did not induce A/E lesions, the *TnphoA* insertion occurring in a gene that was called *paa*, for porcine A/E associated. The distribution of *paa* in PEPEC O45 strains revealed that it was associated with presence of the *eae* gene and its A/E phenotype *in vivo*. On examination of enteric *E. coli* isolates from humans and various animal species, a strong correlation with the presence of *paa* was found in EHEC O157:H7 and O26, and dog, rabbit and pig *eae*-positive isolates, and to a lesser extent in human EPEC *eae*-positive isolates (An *et al.* 1999a). The aim of this study was to characterize the *paa* gene and to study the contribution of Paa to the development of A/E lesions due to PEPEC in a pig ileal explant model.

MATERIAL AND METHODS

Bacterial strains and plasmids. The wild type pathogenic *E. coli* strain 86-1390 (serogroup O45, tetracycline (Tc^R), and streptomycin (Sm^R) resistant) was isolated at the Faculté de médecine vétérinaire, St-Hyacinthe, Québec, Canada, from a 4-week-old pig with postweaning diarrhea. O45 strain 86-1390 induces typical attaching and effacing (A/E) lesions both *in vitro* and *in vivo* and contains sequences homologous to the LEE (Zhu *et al.* 1994; Zhu *et al.* 1995b). A collection of 11 PEPEC strains was used for *in vivo* experiments. *E. coli* strain SM10 λ pir(pRT733) was used to introduce *TnphoA* into strain 86-1390 by conjugation (Harel *et al.* 1992). *E. coli* strain HB101(supE44 *hsdS20* (r-m-) *recA13* *ara-14* *proA2* *lacY1* *galK2* *rpsL20* *xyl-5* *mtl-1*) (Boyer et Roulland-Dussoix 1969) was used as host for recombinant plasmids in this study. The λ ZAPII^R system was used for construction of a genomic DNA library from strain 86-1390 (Stratagene, La Jolla, CA). The host strain *E. coli* XL1 Blue MRF' $\{\Delta(mcrA)183, \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)173, endA1, supE44, thi-1, recA1, gyrA96, relA1, lac[F'proAB lacI^q Z\Delta M15, Tn10(tet^R)]\}$ and *E. coli* SOLR strain $\{e14-(mcrA), \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171, sbcC, recB, recJ, umuC::Tn5(kan^R), uvrC, lac, gyrA96, relA1, \lambda^R[F'proAB lacI^q Z\Delta M15]Su$ (nonsuppressing) $\}$ as well as the helper phage M13 needed in the cloning procedure were used according to the manufacturer's recommendations (Stratagene). E22 is an *eae* β positive REPEC strain (Oswald *et al.* 2000).

***TnphoA* mutagenesis.** Mutations were obtained from random insertion of the *TnphoA* sequence into the chromosomal DNA of *E. coli* strain 86-1390 (Sm^R, Tc^R). This was accomplished as described previously (Harel *et al.* 1992) by using the suicide vector pRT733 which carries the *TnphoA* insertion and the kanamycin resistance (Km^R) gene in *E. coli* strain SM10 λ pir (Taylor *et al.* 1987). Exconjugants from the mating between *E. coli* strain SM10 λ pir(pRT733) and *E. coli* strain 86-1390 were selected on Luria-Bertani (LB) agar (Difco Laboratories, Detroit Mich.) containing kanamycin and streptomycin (40 μ g ml⁻¹) and the alkaline phosphatase substrate XP (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate) (Sigma Chemical Co., St-

Louis, Mo.). Kanamycin and streptomycin resistant blue colonies resulting from the transposition of *TnphoA* into the genome of the recipient strain *E. coli* 86-1390 were stored in glycerol at -70°C . Of the Km^{R} and Sm^{R} transposon insertions, 1% were found to produce blue colonies on agar in the presence of phosphatase alkaline substrate XP.

Cloning and DNA sequencing of *phoA* fusion regions. Cloning of the sequence flanking the 5' end of *phoA* fusion regions was done using the kanamycin resistance gene as a selectable marker and the appropriate DNA fragments were cloned into pBR322. One μg of total DNA isolated from the mutant was digested by *Bam*HI and ligated with 0.1 μg of similarly digested pBR322. The ligation mixture was electroporated into the strain HB101 with a Bio-Rad Gene Pulser according to the manufacturer's instructions (Bio-Rad Laboratories Ltd., Mississauga, Ontario, Canada). Transformants carrying the desired recombinant plasmid were selected on LB agar plates supplemented with ampicillin ($40\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$) and kanamycin ($40\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$). To precisely identify the mutated gene, the double-stranded plasmid DNA at the junction of the site of *TnphoA* insertion was sequenced using a T7 SequencingTM Kit (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada) according to the manufacturer's instructions. An oligonucleotide (5'AATAATCGCCTGAGC3') corresponding to nucleotides 72 to 86 of *TnphoA*, synthesized on a Gene Assembler (Pharmacia LKB Biotechnology Inc., Baie d'Urfé, Québec, Canada), was used as the primer. DNA sequence data was analyzed using the GeneWorks program (Intelligenetics, Inc., CA, USA) and programs included in the GCG (Genetics Computer Group, Madison, WI) package (Devereux *et al.* 1984). The deduced amino acid sequence was compared against the combined databases of the National Center for Biotechnology Information (Washington, D.C.) via the BLAST network service.

Cloning and sequencing of *paa*. To clone the full length of the *paa* gene, corresponding to the gene of the mutant M155 with the *TnphoA* insert, a genomic DNA library of PEPEC strain 86-1390 was constructed in $\lambda\text{ZAPII}^{\text{R}}$ vector. Chromosomal DNA was partially digested with *Eco*RI and pooled and fractionated through a 10-30% sucrose linear gradient. The desired fragments of 6 to 10 kb were

isolated and ligated to dephosphorylated *Eco*RI-digested λ ZAPII^R vector arms and packaged using an *in vitro* packaging system (Stratagene). Bacteriophage particles were propagated in *E. coli* XL1 Blue and plated for plaque isolation. To screen the recombinant phages, a 350 bp PCR fragment derived from the 5' end of the *paa* gene, was generated by two *paa* specific primers, M155-F1 (5'ATGAGGAAACATAATGGCAGG3') and M155-R1 (5'TCTGGTCAGGTCGTCAATAC3') annealed at 91-110 nt and 428-447 nt of the *paa* gene, respectively. The 350 bp fragment was then radiolabelled with [α -³²P]CTP as a probe, using an oligonucleotide random priming labeling kit (Pharmacia LKB) according to the manufacturer's instructions. Positive plaques were selected and excised using the ExAssist helper phage (M13) and *E. coli* SOLR strain system according to the Stratagene λ ZAPII^R instruction manual. Plasmid DNA was isolated by alkaline lysis and the insert was sequenced by an automated DNA Sequencer (AFL DNA sequencer, Pharmacia LKB) using the *paa* specific oligonucleotides synthesized on a Gene Assembler (Pharmacia LKB).

Transcomplementation of the M155 *paa*::*TnphoA* mutant. The *paa* gene was amplified with its promoter regions from the 86-1390 strain DNA using the PaaHO/F (5'GGATCCTTAAAGGGCAGG3') and PaaHO/R (5'GGATCCGATGTCAAGTGC3') primers and cloned into the pGEM-T vector. The *Bam*HI fragment was then inserted into the *Bam*HI linearized pACYC184 plasmid resulting in the pACYC184-PaaHO construct containing the wild type *paa* gene. This construct was used as a complementation plasmid for *paa* in the M155 *TnphoA* mutant leading to the M155c strain.

Quantification of A/E capacity of the mutants. The A/E capacity of the *TnphoA* mutants generated in this study was examined by ileal explant culture as previously described (Zhu *et al.* 1995b). Briefly, overnight bacterial cultures were inoculated onto the villous surface of ileal explants from colostrum-deprived newborn piglets and incubated on a rocking platform at 37°C for 8h in an atmosphere of 95% O₂ and 5% CO₂. RPMI 1640 culture medium (Gibco, BRL, Burlington, Ont., Canada) was replaced with fresh medium at hourly intervals during the incubation to prevent

acidic pH and overgrowth of bacteria. *E. coli* O45 strain 86-1390 and the porcine 862 strain, which does not possess the LEE, were used as positive and negative controls, respectively. Three or four ileal explants were used for each bacterial isolate and the experiments were repeated three times. In some experiments, broth cultures were incubated at 37°C with an equal volume of lyophilized Paa antibody reconstituted with Phosphate Buffered Saline (PBS), for 30 minutes prior to the first explant inoculation. Tissues were processed for light microscopy (LM) examination as described previously (Zhu *et al.* 1995b) and the number of intact villi with adherent bacteria was counted, where 100% is the total number of intact villi observed.

Southern analysis. The number of *TnphoA* insertions was determined by Southern blot analysis as described previously (Harel *et al.* 1992). Briefly, total DNA was extracted from the strain by sodium dodecyl sulfate lysis, proteinase K treatment, phenol chloroform extraction, and ethanol precipitation. Extracted DNA was digested with the restriction endonuclease *SacI* or *EcoRV*, which do not cut within *TnphoA*, under conditions described by the manufacturer (Pharmacia LKB). After separation by electrophoresis in a 0.7% agarose gel, DNA preparations were examined by Southern hybridization. An internal *HindIII-BamHI* fragment of *TnphoA* radiolabelled with [α -³²P]CTP using an oligonucleotide random priming labeling kit (Pharmacia LKB) according to the manufacturer's instructions, was used as a probe.

Chromosomal localization of *paa* gene. Firstly, the presence of *paa* between the *rem* and *rel* loci was investigated by PCR amplification. The *remF* (5'GATGCCTGCCACATCAGAGG3') and *relR* (5'CCTAAGCCAGTACGTGTGAC3') primers located at 2821-2840 bp and 3400-3420 bp, respectively, were used to amplify a 580 bp fragment on the *E. coli* K-12 strain MG1655 chromosome. The *PaaR* primer (5'GCTACAAACCGATGAAGCGGC3') was used in combination with *remF* to detect an insertion of the *paa* gene between the *rem* and *rel* loci leading to a 605 bp amplicon. Secondly, the integrity of the *yciD-yciE* region was tested with the *YciDF* (5'AGTGGCGGCTTTGGCACTAA3') and *YciER* (5'CGAATCTATGCTTGAATCCA3') primers. They were used to amplify a 1122

bp fragment on the MG1655 chromosome. The PCR mixture was : 5 µl of template DNA, 5 µl of 2mM dNTP, 5 µl of 10X buffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl₂, 500 mM KCl pH 8.3), 2.5 µl of each primer pairs (25 pmol), 1 U of Taq DNA polymerase (Pharmacia) and sterile distilled water to 50 µl. The following cycles were used: 1 X 94°C for 2 min., and 30 X (94°C for 30 s, 60°C for 45 s, 72°C for 30 s) with a final extension of 72°C for 7 min. The PCR products were analyzed by agarose gel electrophoresis.

Non-polar mutation in *paa*. A PCR fragment containing the gene and its promoter sequences was amplified with the PaaHO/F and PaaHO/R primers, and cloned into pGEM-T vector (Promega) according to the manufacturer's instructions. The construct was digested with *Kpn*I and an *Hinc*II fragment from pSB315 containing a kanamycin resistance cassette was ligated in the *Kpn*I site resulting in *paa::kan*. The construct was digested with *Bam*HI and the *paa::kan* fragment was ligated to the pKNG101 suicide vector cut with the same enzyme. The resulting construct was transferred to strain S17 λ pir, from which it was mobilized into strain E22 using the membrane filter mating technique. Transconjugants were selected on M9 agar containing the appropriate antibiotic (kanamycin 50 µg/ml). Selection for double-crossover allele replacement was obtained by *sacB* counterselection on LB agar plates without NaCl and containing 5% sucrose (Kaniga *et al.* 1991).

Pulsed field gel electrophoresis. Strains 86-1390, M155, STJ348 (O157:H7) and E2348/69 (EPEC) were inoculated 1/100 in 20 ml of LB medium and incubated at 37°C overnight with agitation. Bacteria were washed two times in SE (75 mM NaCl, 25 mM EDTA, pH 7.5) by centrifugation and resuspended in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8). The optical density of the cells was adjusted to 1.5 – 1.8 at a wavelength of 600 nm. Low-melt agarose (Gibco BRL, Burlington, Ont., Canada) was prepared in distilled water to obtain a final concentration of 1.5%. Plugs were formed by mixing 500 µl of bacterial suspension with 500 µl of prewarmed (60°C) agarose. This mixture was then pipetted into plug molds (Bio-Rad Laboratories). After the plugs solidified, they were incubated at 50°C overnight in lysis buffer (1% w/v N-laurylsarcosine, 0.5 M EDTA, pH 9.5, supplemented with 1mg/ml proteinase

K). The lysis buffer was changed and plugs were incubated for another 4 hours. Plugs were washed three times for 1 hour each time with 1mM PMSF in 10 mM Tris-HCl, pH 8. Another set of three 30 minutes washes was done with 10 mM Tris-HCl, pH 8. The plugs were then preincubated for 30 minutes with 1 ml of the appropriate restriction enzyme buffer. The buffer was replaced by a fresh mixture containing 30-40 units of enzyme and incubated overnight at the appropriate temperature (37°C for *XbaI* and 50°C for *SfiI*). The next day, 10 units of enzyme was added to the plugs for a 2-3 hour incubation period. Electrophoresis of the samples was performed on the CHEF-DRII system by using a 1% pulsed-field grade agarose gel (Sigma) with 2 liters of modified 0,5X TBE running buffer (10X TBE : 89 mM Tris-borate, 25mM EDTA, pH=8.3). The running conditions were as follows : switch of 5-35 sec, 6 volts/cm, run time 20h. Finally, the gel was stained in 10 mg/ml ethidium bromide in distilled water for 30 minutes. Digested genomic DNA separated in agarose gels was transferred to positively charged nylon membranes (Immobilon-Ny⁺, Millipore Corporation, Bedford, MA) in accordance with the manufacturers' instructions and hybridized under stringent conditions as described by Sambrook *et al.* (Sambrook *et al.* 1989). The probe was labeled with biotin by PCR amplification using PaaF (5'GGATCCATGAGGAACATAA3') and PaaR (5'CTCGAGAGTGCCTTTCCTGG3').

Production of anti-Paa antibodies. The *paa* gene of strain 86-1390 was amplified by PCR using primer pairs PaaF and PaaR. The amplicon was inserted into the pQE-30 expression vector (Qiagen) using appropriate cloning sites and fusion was confirmed by sequencing. *E. coli* M15 (pREP4) (Qiagen) was used as the host strain for the expression of recombinant His-Paa. The His-Paa was purified from a Ni-NTA affinity column (Qiagen). Laying hens of 25weeks of age were immunized intramuscularly (IM) with 500 µl of incomplete Freund's adjuvant (IFA) and an equal volume of purified His-Paa, corresponding to 50 µg of protein. Paa-specific IgY was then extracted from egg yolks by the method described by Akita and Nakai (Akita et Nakai 1993a), with some modifications. Briefly, egg yolks were separated from the albumin. An equal volume of PBS was added to the egg yolks, then homogenized by

Vortex agitation. An equal volume of chloroform was added, then mixed until a solid homogenate was obtained. The preparation was centrifuged for 5 minutes at 14 000 x g, and the supernatant containing IgY was recovered, lyophilized, and conserved until use. The Anti-Paa IgY titer was determined by ELISA using microtiter plates (Immulon 2HB, Dynec) precoated with 100 ng per well of purified protein in carbonate buffer (pH 9.6).

Electron microscopy. Electron microscopy and immunogold labeling was done as previously described (Harel *et al.* 1995) with modifications. Cultures of the wild type strain 86-1390, transcomplemented mutant strain M155c, and *paa*-negative control strain 862 were grown overnight at 37°C in TSB, and washed three times in PBS. Bacterial pellets were obtained using an AirFuge air-driven ultracentrifuge (Beckman Instruments inc., Palo Alto, CA, USA) and were coated on 150 Mesh formvar-coated nickel grids (Marivac, Nova Scotia, Canada). After a blocking step in 5% normal donkey serum, grids were labeled with appropriate dilutions of chicken anti-Paa primary antibody, previously adsorbed against the *paa*-negative *E. coli* strain E2348/69, and donkey anti-chicken IgY secondary antibody conjugated with 12 nm colloidal gold beads (Jackson ImmunoResearch Laboratories inc., USA). Grids were negatively stained with 1% phosphotungstic acid at pH 6.0, examined using a Hitachi H-7100 transmission electron microscope at 75 kV (Hitachi High-Technologies, On, Canada). Anti-Paa antibody adsorbed with the Paa-positive strain M155c was used as negative control.

Ileal explant tissues were processed for transmission electron microscopy. Tissues were fixed for 2 hours at room temperature in 2.5% glutaraldehyde and rinsed in 0.1M cacodylate buffer at pH 7.3. Tissues were then post-fixed in 2% osmium tetroxyde (OsO₄), rinsed in water, dehydrated in a graded ethanol series, and finally embedded in Spurr resin (Marivac, Nova Scotia, Canada). Thin sections were mounted on copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and examined with a Philips 420 transmission electron microscope at 80 kV (Philips electronics, The Netherlands).

Infection of gnotobiotic piglets. Eleven porcine O45 strains were tested for A/E activity in experimentally inoculated newborn gnotobiotic piglets as previously described (Zhu *et al.* 1994). Briefly, aseptically collected piglets were inoculated intragastrically with 10 ml of an overnight culture of *E. coli* (approximately 10^9 CFU) and 10 ml of 0.1% peptone water. They were examined several times daily for development of clinical signs and necropsied when diarrhea occurred or at 120 h post inoculation (p.i.) if clinically normal.

Statistical analysis. Results are presented as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean. A Kruskal-Wallis test was performed with commercially available software (SAS 8.1, Cary, North Carolina, USA), and post hoc 2-by-2 comparisons were done to assess differences between the groups; $P < 0.05$ was taken to be significant.

RESULTS

Identification of a transposon mutant deficient in attaching and effacing activity. After random insertion of *TnphoA* into the genome of porcine O45 *E. coli* strain 86-1390, mutants containing translational fusions between bacterial genes for extracytoplasmic proteins and *phoA* were screened on LB agar supplemented with Km, Sm and with substrate XP. A total of 180 *TnphoA* mutants were then examined in a qualitative assay for adhesion to piglet ileal explants (Zhu *et al.* 1995b). Of these, 175 mutants were found to attach extensively to a similar extent as strain 86-1390, as observed by light microscopy (An *et al.* 1999a) (Fig. 1A). In the five other mutants which attached less extensively to piglet ileal enterocytes, different insertion sites of the *TnphoA* were observed. Three insertions were in genes found in *E. coli* K12 (*osmB*, two in *pstS*), one was in *IS100*, and one was in an as yet uncharacterized gene and was named mutant M155. This gene was called *paa* (porcine A/E associated). Hence, only this latter mutant was retained for further characterization. The presence of a single copy of *TnphoA* in the chromosomal DNA of the mutant M155 was demonstrated using Southern hybridization of genomic DNA digested by *SacI* or *EcoRV* and probed with an internal *BamHI-HindIII* fragment of *TnphoA* (data not shown).

Effect of the Paa mutation and complementation on the adherence phenotype. The insertion of *TnphoA* in the *paa* gene (M155 mutant) resulted in a significantly reduced number of ileal villi showing bacterial adherence to epithelial intestinal cells, as compared to that observed for the wild type 86-1390, in our explant culture model (Fig. 2A). As observed for negative control strain 862 (Fig. 1B), there was a patchy, loose association of mutant M155 with the mucosal surface of a low proportion of villi. Furthermore, the complementation of strain M155 with the pACYC184 plasmid carrying the *paa* gene and its promoter region (M155c strain) restored the adherence phenotype. On transmission electron microscopy (TEM), for the M155c and 86-1390 strains, bacteria demonstrated a tight attachment to epithelial cell surfaces, effacement of microvilli beneath the adherence site, and a dense region underneath the adherence site representing F-actin polymerization (Fig. 3A and 3B),

whereas mutant M155 and control strain 862 showed no evidence of A/E lesion formation (Fig. 3C).

Sequence analysis of *paa* and associated loci . To further characterize the locus around the site of the *TnphoA* insertion of mutant M155, a genomic DNA library of PEPEC strain 86-1390 was screened. On primary screening, several of the plaques hybridized to the 350 bp PCR probe fragment which corresponded to the sequence adjacent to the *TnphoA* insertion of mutant M155 and had been radiolabeled with [α - 32 P]CTP. One of these, with an insert of 6 kbp and designated λ ZAPII^R AN1, was chosen for further study. Using primers obtained from the sequence adjacent to the *TnphoA* insertion in M155, we determined the nucleotide sequence of the full length of the gene where *TnphoA* was inserted. The complete nucleotide sequence was lodged with GenBank under accession number U82533 (*paa* was previously named *anm*). It revealed an open reading frame (ORF) of 753 bp. The region upstream of the first ATG was preceded by excellent matches to consensus sequences for -35 and -10 putative promoter regions and by a Shine Dalgarno sequence (Fig. 4). Downstream of the TAG translational stop codon, a putative transcription terminator was evident (Fig. 4). The G+C content of *paa* was 44%, which is substantially lower than that of *E. coli* K-12 (50.8%), (Blattner *et al.* 1997) suggesting that *paa* may have been acquired by 86-1390 through horizontal transfer. *paa* was predicted to encode a 251 amino-acid protein with an anticipated molecular mass of 27.6 kDa (Fig. 4). The prediction of the Paa protein localization site using the Expasy software suggested that the Paa peptide may be cleaved after the first 18 residues (von Heijne 1986) (Fig. 4). The hydrophobicity profile indicated the presence of a potential transmembrane region (amino acids 1 to 18) corresponding to a Sec-dependent signal sequence, and hydrophilic segments in mature Paa. However, the Expasy program also predicted that the entire Paa protein could be unstable due to its N-terminal end. The Domain Architecture Retrieval Tool (DART) in NCBI identified a sulfate-binding motif in the C-terminal half of the protein. The comparison with the SWISS-PROT database showed that the amino-acid sequence of *paa* gene displayed an identity of 100% with the *paa* gene of the O157:H7 EDL933 and Sakai strains, 51.8% with PEB3, a major

antigen of *Campylobacter jejuni* and 49% with AcfC, a gene product of the *Vibrio cholerae* accessory colonization factor (Fig. 5). AcfC and PEB3 also contain the same sulfate-binding motif.

Localization of *paa* on the chromosome. The 3.5 kb region containing *paa* was also 100% identical to the same region in the O157:H7 EDL933 and Sakai strains. Upstream of *paa*, there was an homology with the *prpH* gene encoding a fimbrial protein precursor of Pap-related pilus H. Downstream of *paa*, was a sequence displaying identity to the *rem* gene from *E. coli* K-12. This may indicate that *paa* has interrupted the *relB-rem* region. Indeed the amplification by PCR of the *relB-rem* showed that this region is disrupted in many *paa*-positive strains (data not shown). On the other hand, amplification was successful when using a set of *paa-rem* primers. Localization of *paa* in the genome of O157:H7 strains EDL 933 and Sakai demonstrated that *paa* was inserted at 28.3 minutes within the *yciD-yciE* locus of the K-12 chromosome. PCR studies confirmed this result: nine out of fourteen (64%) EPEC strains isolated from pigs, two of seven (29%) REPEC strains and three of four human EHEC strains (75%) were interrupted in the region between the *yciD* and *yciE* genes from *E. coli* K-12 (Table I). Thus, in the O157:H7 strains EDL933 and Sakai, *paa* belongs to O-island #57 or to the Sp9 region respectively, inserted within *yciD* and *yciE*. These islands contain incomplete lambda-like phage sequences (phage CP-933O for EDL933, phage Sp9 for Sakai). In PEPEC strains, the *paa* region is also within *yciD-yciE*. Moreover, in these genomes the *relB-rem* region is disturbed and a copy of *rem* is found near the 3' end of *paa*. Genome analysis of the two studied O157:H7 strains indicates that *paa* is in a region specific to these pathogenic strains, which harbors the sequence of a lambda phage.

The chromosome of different AEEC strains was digested with *SfiI* or *XbaI* and examined by pulsed field electrophoresis and Southern blot. For each of the two digests, a *paa* biotinylated probe hybridized with only one fragment of about 210 kbp (*XbaI*) or 120 kbp (*SfiI*) for strains 86-1390 and M155 and about 290 kbp (*XbaI*) or 210 kbp (*SfiI*) for EHEC O157:H7 STJ348 strain, indicating different chromosomal arrangement in this latter strain with respect to the two former strains. There was no

hybridization for the *paa*-negative EPEC strain E2348/69. In *paa*-positive strains, *paa* was present in only one copy in the chromosome.

Creation of a *paa* mutant by allelic exchange and complementation.

Creation of a *paa* mutant by allelic exchange on the chromosome of PEPEC strain 86-1390 was unsuccessful. However, a *paa* mutant (E22 Δ *paa*) was obtained from strain E22, a *paa*-positive REPEC strain that induces A/E lesions in our porcine *ex vivo* model. Strain E22 Δ *paa* showed a reduced adherence phenotype (Fig. 2B), and was not able to induce A/E lesions in the *ex vivo* model. The complementation of E22 Δ *paa* with the wild-type *paa* restored this phenotype (Fig. 2B).

Development of A/E lesions *in vivo* by *paa*-positive and *paa*-negative PEPEC strains. Most tested *eae*-, *paa*-positive porcine O45 isolates induced severe A/E lesions leading to diarrhea appearing from 24 to 70 hours after infection (Table II). The severity and extent of the A/E lesions appeared to be related to the time of onset and severity of diarrhea in the inoculated piglets. On the other hand, *eae*-positive, *paa*-negative isolates induced less severe or no A/E lesions and piglets developed no diarrhea or mild diarrhea after 83h p.i..

Capacity of anti-Paa antibodies to block adhesion. Treatment with chicken egg yolk anti-Paa antibodies significantly reduced, by up to 53 %, the proportion of intact villi showing intimate adherence, following inoculation of pig ileal explants with PEPEC strain 86-1390 *ex vivo* (Fig 6), when compared to treatment with egg yolk antibodies from hens immunized with a sonicated preparation from the Paa-negative host strain M15 (pREP4).

Paa protein is located at the bacterial surface. Immunogold labeling was performed in order to locate the Paa protein using the wild-type strain 86-1390 and the transcomplemented mutant strain M155c labeled with the anti-Paa polyclonal antiserum. The Paa protein was uniformly distributed over the bacterial surface of the transcomplemented mutant strain M155c (Fig. 7A) and, to a lesser extent, on the bacterial surface of the strain 86-1390 (data not shown). Moreover, the expression of the Paa protein was 7-fold higher in M155c compared to that of the wild-type strain

86-1390 (data not shown). Low expression of Paa was confirmed when testing the PhoA activity of the fusion protein Paa-PhoA of the *TnphoA* mutant M155 in similar conditions (data not shown). When strains were labeled with the Paa-adsorbed antibody preparation, only a few gold beads were present, mostly in the background, confirming the specificity of the labeled antibody (Fig. 7B).

DISCUSSION

In this study, we have identified by transposon mutagenesis using a PEPEC strain a locus important for development of A/E lesions, that we named *paa*. The mutant *paa::TnphoA* was no longer able to adhere to microvilli of intestinal epithelial cells and to create A/E lesions. *paa* sequences are often present in A/E strains, especially O157:H7 strains. The predicted amino acid sequence of Paa is identical to that of the Paa of O157:H7 strain EDL933 and Sakai (Hayashi *et al.* 2001; Perna *et al.* 2001) and very similar to that of the PEB3 and AcfC proteins. PEB3 is a major surface antigen involved in the pathogenicity of *Campylobacter jejuni* and was shown to be very unstable at ambient temperature. This feature is also shared with Paa. AcfC is part of the TCP *acf* gene cluster which has previously been shown to be required for efficient intestinal colonization and biogenesis of toxin-associated pilus of *Vibrio cholerae* (Peterson et Mekalanos 1988). Genomic analysis of numerous *V. cholerae* strains (O1, non-O1 and O139) revealed that only vibrios capable of causing epidemic Asiatic cholera possessed the TCP-ACF colonization gene cluster (Kovach *et al.* 1996). AcfC is possibly secreted by *V. cholerae* cells into the culture supernatant (Everiss *et al.* 1994). It is not known if Paa plays a role similar to that of AcfC. Paa, in contrast to AcfC, was shown to be associated mostly with the bacterial pellet and was best expressed in LB broth at 30°C (data not shown). Furthermore, immunogold labeling indicated that the Paa protein is distributed on the bacterial surface in strains 86-1390 and M155c. Nevertheless, the *paa* gene encodes a protein involved in the mechanism of pathogenesis of infection due to strain 86-1390. This gene is absent in non-pathogenic *E.coli*, and the G+C content of *paa* (44%) differs from that of K12 *E. coli* (50.8%).

The regions flanking *paa* in PEPEC 86-1390 were sequenced for a total of 3.5 kb. Upstream of *paa*, there is a truncated gene homologous to *prpH*, coding for a subunit of the H pilus, a member of the Pap family, and downstream of *paa* are two genes homologous to *gef* and *rem*. The *gef* gene encodes a putative toxic protein similar to the Hok/Gef family and *rem* has no known function. This region containing *paa* in the 86-1390 strain is 100% identical to the region containing *paa* in the

O157:H7 strains EDL933 and Sakai. In the Sakai strain, this region is enclosed in a region of 58.2 kb, specific to the pathogen, localized between *yciD* and *yciE* of *E. coli* K12 MG1655. This 58.2 kb region contains a lambda prophage that harbors virulence-related genes encoding proteins such as Lom and TrcA homologues. Lom is a member of a family of outer membrane proteins associated with virulence in two enterobacterial species. Expressed in lysogens, this protein confers the ability to survive in macrophages (Barondess et Beckwith 1990). TrcA is reported to be a chaperone molecule in EPEC strains (Tobe *et al.* 1999). The prophage contains insertions of IS elements and deletions, and thus is presumably defective (Ohnishi *et al.* 2001). In strain EDL933, the region containing *paa* is inserted in a larger region of 103.1 kb, also localized between *yciD* and *yciE*. We can suppose that these flanking sequences are also found in the PEPEC 86-1390 strain. These data suggest *paa* could be part of a new putative pathogenicity islet.

The distribution of *paa* in PEPEC O45 strains revealed that it was associated with the presence of *eae* and the A/E phenotype *in vivo* and *in vitro* (An *et al.* 1999a). The correlation between the presence of *paa* and *eae* among the isolates from humans and animals suggests that *paa* may be more frequently required in the A/E activity of EHEC and dog isolates than in the A/E activity of rabbit, pig O45, and human EPEC isolates (An *et al.* 1999a). The presence of the *paa* gene could reflect some differences in the mechanisms of A/E activity and/or the development of diarrhea in isolates from different animal species and categories such as EHEC and EPEC. The explant culture technique has proved to be an efficient way to study the A/E phenotype of PEPEC strains *ex vivo* (Zhu *et al.* 1995b). Moreover, use of ileal explants from the same animal species as that from which the isolates originated eliminates problems due to lack of species-specific recognition of receptors by bacterial adhesins. The observation that three *eae*-positive but *paa*-negative porcine O45 strains were A/E negative provides further evidence for the importance of the *paa* gene in the A/E activity of porcine O45 strains. These results are confirmed by demonstration in the *ex vivo* model of a clear decrease in the number of ileal villi showing bacterial intimate adherence for *paa* mutants as compared to their wild type PEPEC and REPEC strains. Complementation of the mutants with the *paa* gene

restored adherence capacity to a level similar as that of the wild type strain (Fig. 1) confirming the importance of *paa* in PEPEC O45 strain 86-1390 and REPEC strain E22. However, we observed that the growth rate of strain M155 complemented with the high copy number plasmid pCRII carrying the *paa* gene and its promoter sequence was lower than that of M155 complemented with *paa* carried by the low copy number plasmid pACYC184. This suggests that an overexpression of Paa may be toxic in the wild type *E. coli* strain. In experimental infection of newborn piglets, the *paa*-negative isogenic strain was less adherent than the wild-type strain in the ileum but as adherent as the wild strain in the cecum or colon (data not shown). This reflects the results obtained with the ileal *ex vivo* model, in which the *paa*-negative strain is less adherent than the wild type. This also could indicate that *paa* may have a more important role in early colonization of the ileum. Moreover, the localization of the Paa protein at the bacterial surface and the ability of Paa-specific antibodies to reduce the adherence level of the PEPEC strain 86-1390 clearly demonstrates the involvement of Paa protein in the AE lesion formation, possibly in the initial adherence process. These results also indicate that Paa protein could be a potential candidate for a vaccine, together with Eae and Tir.

Interestingly, Paa contains a sulfate-binding domain, such motifs also being associated with microbial adherence. For instance, numerous pathogens such as *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori* or *Pseudomonas aeruginosa* bind to the host cell surface via heparan-sulfate (HS). Gram positive bacteria, viruses and parasites also bind HS on host cells (Rostand et Esko 1997; Plotkowski *et al.* 2001). Furthermore, infection studies in gnotobiotic piglets also suggested that the Paa protein is involved in the first step of PEPEC pathogenicity, particularly in the initial bacterial adherence, since *paa* defective strains showed a reduced adherence and no or a delayed onset of diarrhea. All this data indicates that Paa contributes to the intimate-adherence phenotype and might be a new adhesin. Its receptor could be heparan-sulfate as with other pathogens. Paa may have a similar role to that of other adherence-conferring molecules of *E. coli* such as Efa1, Iha, ToxB, and Afa. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by STEC (Stevens *et al.* 2002), while Iha facilitates the adherence of *E. coli* O157:H7 to epithelial cells (Tarr *et al.* 2000).

ToxB is important for full expression of adherence by affecting the production and secretion of some virulence factors required for the development of A/E lesions with O157:H7 strains (Tatsuno *et al.* 2001), and EPEC Afa was suggested to function as an initial adhesin (Keller *et al.* 2002). The more precise role of *paa*, which is associated not only with AEEC but also with some pig enterotoxigenic *E. coli* (An *et al.* 1999a), is under investigation.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported in part by the Fonds pour la Formation des Chercheurs et l'Aide à la Recherche du Québec (FCAR) grant 0214, by the Natural Sciences Engineering Research Council of Canada (NSERC) grant 215841-98 and by EU-Community "Quality of Life" QLK2 2000-0060. We thank Bernadette Foiry for her technical assistance, Guy Beauchamp for statistical analysis, Diane Montpetit and Robert Alain for electron microscopy, Hojabr Dezfulian for PFGE and John Leong for critical reading of the manuscript.

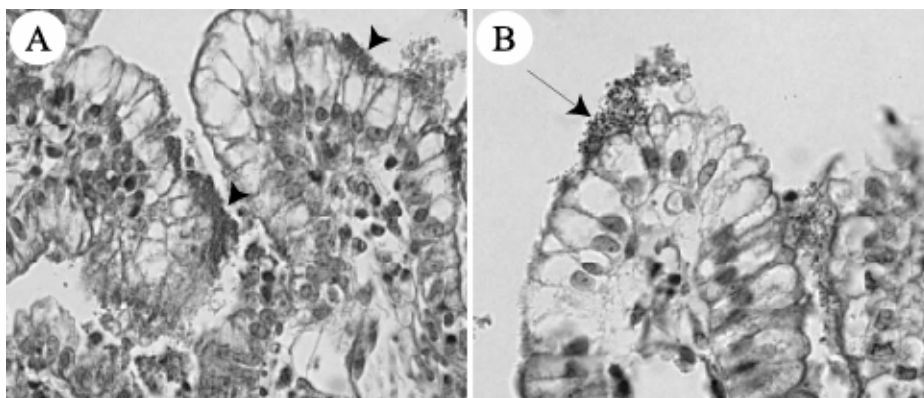


Figure 1. Light microscopy micrographs of ileal explants inoculated with the wild type O45 strain 86-1390 (A) or with the LEE-negative strain 862 (B). Strain 86-1390 showed typical intimate adherence pattern (arrowheads) with irregularity of the associated epithelial cells whereas a loose association of bacteria with the intestinal mucosa of some villi with no obvious change in associated epithelial cells (arrow) was observed for negative control strain 862. Magnification: 400x.

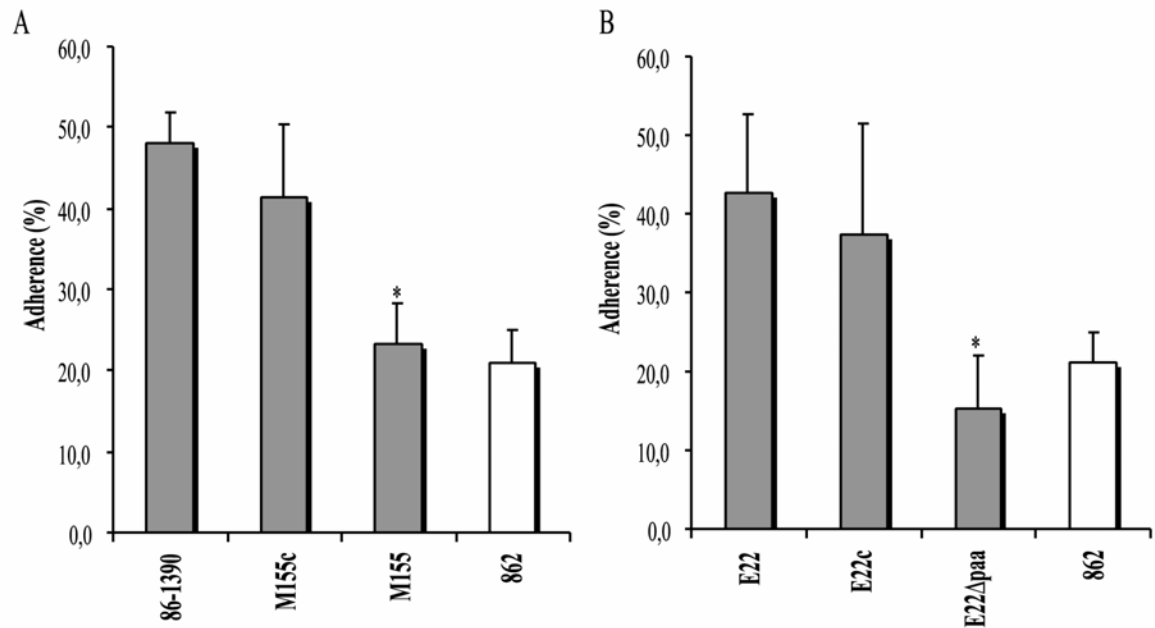


Figure 2. Adherence of wild-type strains and their *paa*- mutant strains. (A) *paa* mutant strain M155 (n=18) showed a decreased number of intact ileal villi with bacterial adherence to epithelial cells, compared to wild-type PEPEC strain 86-1390 (n=12) and to the complemented mutant strain M155c (n=20). The porcine strain 862 (n=15), which does not possess the LEE, was used as negative control. (B) *paa* mutant strain E22 Δ paa (n=19) showed a decreased number of intact ileal villi compared to wild-type REPEC strain E22 (n=19) and to the complemented mutant strain E22c (n=10). Error bars show the standard deviation of the mean. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.0001$, when compared by Kruskal-Wallis test) from wild-type strains 86-1390 and E22 respectively.

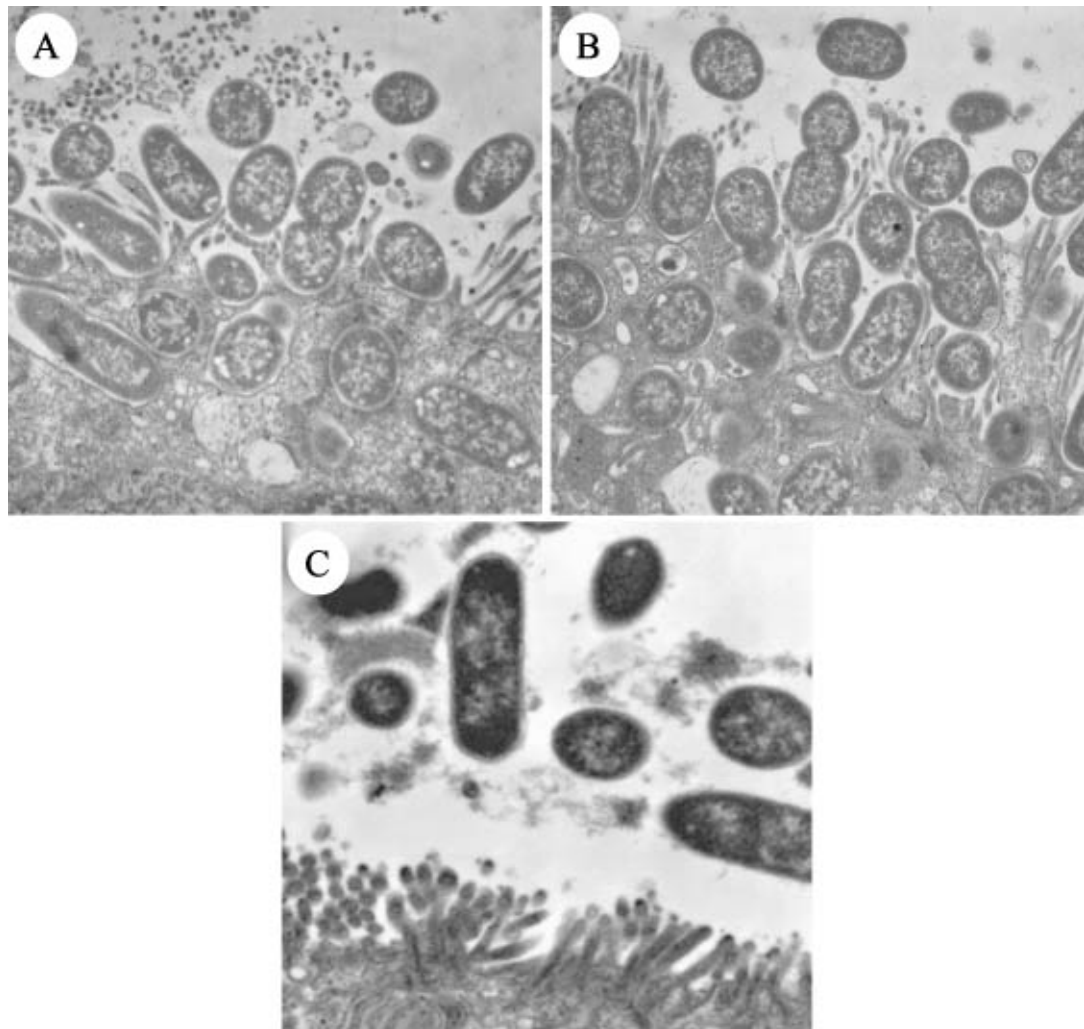


Figure 3. Transmission electron micrographs of ileal explants inoculated with the wild type O45 strain 86-1390 (A, magnification x20658), the complemented mutant strain M155c (B, magnification x3300) or with *TnphoA* mutant M155 (C, magnification x13500). Typical A/E lesions were observed for both wild type and complemented mutant strains, whereas bacteria in the lumen, without any direct contact with the epithelium, were observed for the mutant M155.

Figure 4. The nucleotide and deduced amino acid sequences of *paa* and of its flanking sequences. The putative -10 and -35 promoter sites, the ribosome binding site (RBS) and the putative transcription terminator are underlined. The translation initiation codon and the TAG translation termination codon are in boldface type. The vertical arrow indicates the potential peptide signal cleavage site. Arrowhead represents the insertion site of *TnphoA*.

```

Paa      MRNIMAGF--LIFLSS-AAYADINLYGPGGPHALLDAAKLYAEKTGIIVNVHYGPQNKW 57
0157_H7  MRNIMAGF--LIFLSS-AAYADINLYGPGGPHALLDAAKLYAEKTGIIVNVHYGPQNKW 57
PEB3     MKKIITLFGACALAFS-MANADVNLGPGGPHALTALKDIANKYSEKTGVKVNVPNGPQATW 59
AcfC     MKSKNRLLISLLSFSTSVFADVNLGPGGPHVPLIKVAESFEKSQSKRVNITFGPQATW 60
          *: . : : *: . ** :***** . * . * : : . . ** : **** . *

Paa      NEDAKKNADILFGASEQSALAIIRDHKDSFSEKDIQPLYLRKSILLVKKGNPKNIRSIDD 117
0157_H7  NEDAKKNADILFGASEQSALAIIRDHKDSFSEKDIQPLYLRKSILLVKKGNPKNIRSIDD 117
PEB3     FEKAKKNADILFGASDQSALAIASDFGKDFNVSKIPLYFREAIILTQKGNPLKIKGLKD 119
AcfC     NDKAKKNADILFGASEHSALAIAGHSEKDFSKFNIHPVFMREAIILVKKGNPKNIKGMAD 120
          : .***:*****:***** . . . * . . * : : : * : : * : : * : : *

Paa      LTRPGIGIVNDGGGTSNTSGTGVWEDIAGRKGNIETVAIRKNIILYAPNSGTARKALE 177
0157_H7  LTRPGIGIVNDGGGTSNTSGTGVWEDIAGRKGNIETVAIRKNIILYAPNSGTARKALE 177
PEB3     LANKKVRIVVPEGAGKSNSTSGTGVWEDMI GRTQDIKTIQNFRRNIVAFVPSNGSARKLFA 179
AcfC     LLKPGIGIVNDGAGVSNSTSGTAVWEDSVGRMKNVEKLQAFRSNIHVFAPNSGSARKAFV 180
          * . : : * : * * ***** . ***** ** : : : : * : * : : * : * :

Paa      NQPGADVWITWADWAASNPEIGDVVEIAPDYVIWRDMNITVRQDANDETRRFAEWLQ-TD 236
0157_H7  NQPGADVWITWADWAASNPEIGDVVEIAPDYVIWRDMNITVRQDANDETRRFAEWLQ-TD 236
PEB3     -QDQADAWITWIDWSKSNPDIGTAVAIKDLVYRTFNVIAKEGASKETQDFIAYLS-SK 237
AcfC     DGEDIDAWITWDAIANPTIGDMVRMEDEYRIYRDFNVVLAKNPSSAIDFFDYLTKSK 240
          . * .***** ** : : ** ** * : : : : * : : : . . . . * : * : .

Paa      EAAPAFKKYGWTRKGT 252
0157_H7  EAAPAFKKYGWTRKGT 252
PEB3     EAKEIFKKYGWRE--- 250
AcfC     DAEAIFQHYGWFK--- 253
          : * : : : * : .

```

Figure 5. Alignment of the deduced amino acid sequences between the Paa of the 86-1390 strain and the Paa protein of the O157:H7 EDL933 and Sakai *E. coli* strains, the AcfC protein of *Vibrio cholerae* and the PEB3 protein of *Campylobacter jejuni*. * represents identical or conserved residues in all sequences in the alignment. : indicates conserved substitutions and • indicates semi-conserved substitutions. The amino acid sequence alignment was performed using the Clustal W program.

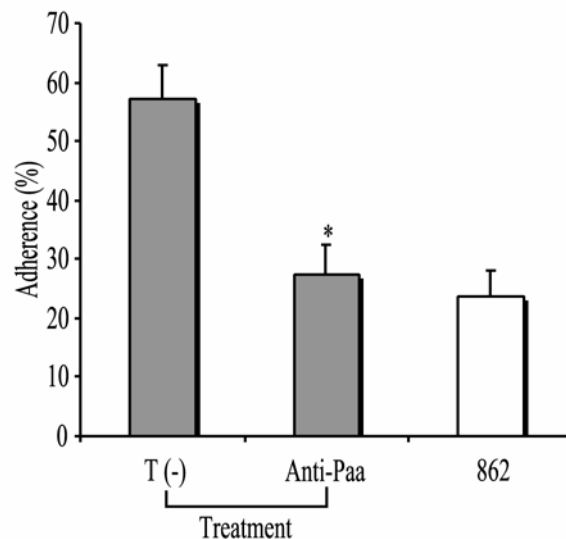


Figure 6. Reduction of the percentage of intact villi showing intimate adherence when pig ileal explants are inoculated with PEPEC strain 86-1390 following treatment with anti-Paa antibodies, compared to explants inoculated with strain 86-1390 following treatment with antibodies from hens immunized with a sonicate preparation from host strain M15 (pREP4), T(-). The porcine strain 862, which does not have the LEE, was used as negative control. The asterisk indicates a statistically significant difference ($P < 0.0001$, when compared by Kruskal-Wallis tests) from the T(-) treatment.

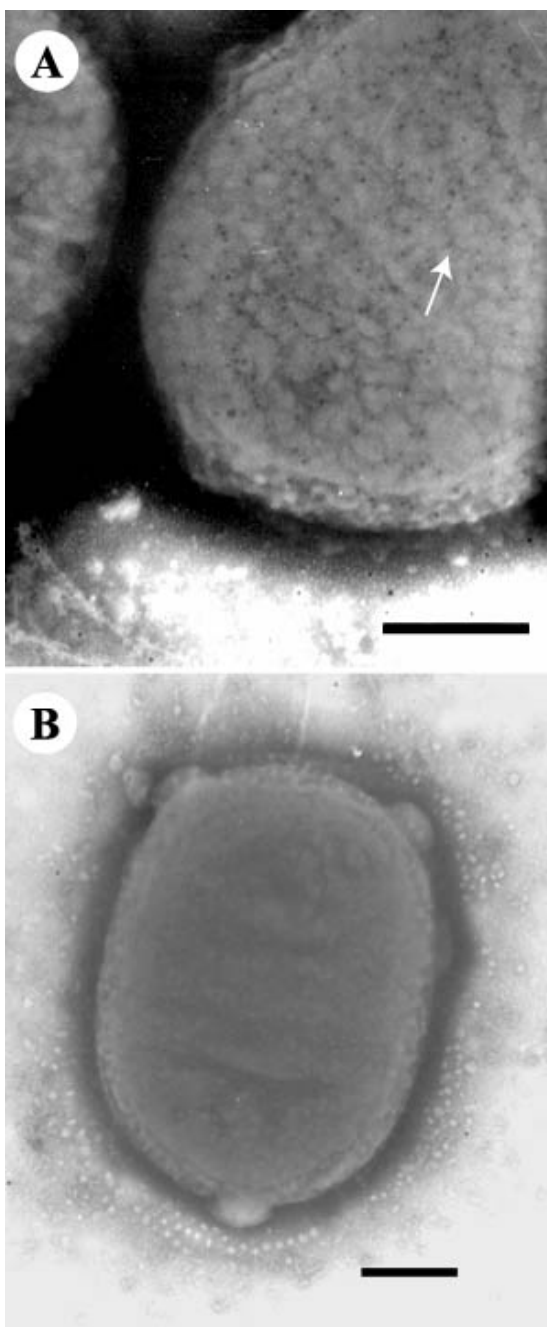


Figure 7. Transmission electron micrographs showing the uniform distribution of immunogold-labelled Paa protein over the bacterial surface of the transcomplemented strain M155c (A) following a 37°C overnight growth in TSB. When anti-Paa serum was adsorbed against the Paa protein, only a few gold beads were observed for strain M155c, mostly in the background (B). Bar=300nm.

Table I: Testing of the integrity of the *yciDE* region in *paa*-positive strains

Strains	Total	<i>yciDE</i> negative ^b	<i>yciDE</i> positive ^a
EHEC	4	3	1
REPEC	7	2 (E22, RDEC-1)	5
PEPEC	14	9 (86-1390)	5
Total	25	14 (56%)	11 (44%)

^aStrains considered positive amplified a 1122 pb fragment, ^bwhereas no amplification was seen in the negative strains.

Table II: Clinical and histopathological findings in piglets inoculated with porcine *E. coli* O45 isolates.

Porcine O45 strains <i>eae</i> and LEE positive	No of pigs with diarrhea /no inoculated	Onset of diarrhea (h) ^b	Extent of A/E lesions ^d	Presence of <i>paa</i> gene
81-4420	2/2	24	++++	+
86-1390	2/2	30	++++	+
91-19-172	2/2	35	++++	+
90-2061	2/2	39	+++	+
90-1513	2/2	41	+++	+
88-4299	1/1 ^a	44	++	+
86-4733	2/2	70	+	+
83-2315	2/2	83	++	-
88-1861	1/1 ^a	91	-	-
89-56-196	1/2	96	-	-
82-4378	0/2	NM ^c	+	-
81-1786	1/2	85	-	-
(Control <i>eae</i> neg)				

^a : One piglet died of causes unrelated to the infection within 20h after birth. ^b : Mean time of onset of diarrhea post-inoculation. ^c : NM, non measurable data. ^d : +++++, extensive bacterial colonization and severe effacement of microvilli; +++, large areas of bacterial colonization and heavy effacement; ++, focal lesions; +, small scattered focal lesions; -, no lesions observed.

REFERENCES

- Akita, E. M. and S. Nakai** 1993a. Comparison of four purification methods for the production of immunoglobulins from eggs laid by hens immunized with an enterotoxigenic *E. coli* strain. *J Immunol Methods* **160**(2): 207-14.
- An, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels and J. Harel** 1999a. Distribution of a novel locus called Paa (porcine attaching and effacing associated) among enteric *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* **473**: 179-84.
- An, H., J. M. Fairbrother, C. Desautels, T. Mabrouk, D. Dugourd, H. Dezfulian and J. Harel** 2000. Presence of the LEE (locus of enterocyte effacement) in pig attaching and effacing *Escherichia coli* and characterization of *eae*, *espA*, *espB* and *espD* genes of PEPEC (pig EPEC) strain 1390. *Microb Pathog* **28**(5): 291-300.
- Baldwin, T. J., W. Eard, A. Aitken, S. Knutton and P. H. Williams** 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **59**: 1599-1604.
- Barondess, J. J. and J. Beckwith** 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage lambda. *Nature* **346**(6287): 871-4.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau and Y. Shao** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**(5331): 1453-74.
- Boyer, H. W. and D. Roulland-Dussoix** 1969. A complementation analysis of the restriction and modification of DNA in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* **41**(3): 459-72.

Broes, A., R. Drolet, M. Jacques, J. M. Fairbrother and W. M. Johnson 1988. Natural infection with an attaching and effacing *Escherichia coli* in a diarrheic puppy. Can J Vet Res **52**(2): 280-2.

Cantey, J. R. and R. K. Blake 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in rabbit: a novel mechanism. J Infect Dis **135**: 454-62.

Devereux, J., P. Haeberli and O. Smithies 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucleic Acids Res **12**(1 Pt 1): 387-95.

Donnenberg, M. S. and J. B. Kaper 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun **60**: 3953-61.

Elliott, S. J., L. A. Wainwright, T. K. McDaniel, K. G. Jarvis, Y. Deng, L. Lai, B. P. McNamara, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. Mol Microbiol **28**(1): 1-4.

Everiss, K. D., K. J. Hughes and K. M. Peterson 1994. The accessory colonization factor and toxin-coregulated pilus gene clusters are physically linked on the *Vibrio cholerae* 0395 chromosome. DNA Seq **5**(1): 51-5.

Fagundes-Neto, U. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in infants : clinical aspects and small bowel morphological alterations. Rev Microbiol **27**: 117-19.

Foubister, V., I. Rosenshine, M. S. Donnenberg and B. B. Finlay 1994b. The *eaeB* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* is necessary for signal transduction in epithelial cells. Infect Immun **62**: 3038-40.

Francis, D. H., J. E. Collins and J. R. Duimstra 1986. Infection of gnotobiotic pigs with an *Escherichia coli* O157:H7 strain associated with an outbreak of hemorrhagic colitis. *Infect Immun* **51**(3): 953-6.

Harel, J., H. Lapointe, A. Fallara, L. A. Lortie, M. Bigras-Poulin, S. Lariviere and J. M. Fairbrother 1991. Detection of genes for fimbrial antigens and enterotoxins associated with *Escherichia coli* serogroups isolated from pigs with diarrhea. *J Clin Microbiol* **29**(4): 745-52.

Harel, J., C. Forget, M. Ngeleka, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1992. Isolation and characterization of adhesin-defective *TnphoA* mutants of septicaemic porcine *Escherichia coli* of serotype O115:K-:F165. *J Gen Microbiol* **138**(Pt 11): 2337-45.

Harel, J., M. Jacques, J. M. Fairbrother, M. Bosse and C. Forget 1995. Cloning of determinants encoding F165(2) fimbriae from porcine septicaemic *Escherichia coli* confirms their identity as F1C fimbriae. *Microbiology* **141**(Pt 1): 221-8.

Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori and H. Shinagawa 2001. Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12. *DNA Res* **8**(1): 11-22.

Hélie, P., M. Morin, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1991. Experimental infection of newborn pigs with an attaching and effacing *Escherichia coli* O45:K"E65" strain. *Infect Immun* **59**(3): 814-21.

Janke, B. H., D. H. Francis, J. E. Collins, M. C. Libal, D. H. Zeman and D. D. Johnson 1989. Attaching and effacing *Escherichia coli* infections in calves, pigs, lambs, and dogs. *J Vet Diagn Invest* **1**: 6-11.

Jarvis, K. G., J. A. Girón, A. E. Jerse, T. K. McDaniel, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching-effacing lesions formation. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**: 7996-8000.

Jerse, A. E., J. Yu, B. D. Tall and J. B. Kaper 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **87**: 7839-43.

Kaniga, K., I. Delor and G. R. Cornelis 1991. A wide-host-range suicide vector for improving reverse genetics in gram-negative bacteria: inactivation of the *blaA* gene of *Yersinia enterocolitica*. *Gene* **109**(1): 137-41.

Keller, R., J. G. Ordonez, R. R. de Oliveira, L. R. Trabulsi, T. J. Baldwin and S. Knutton 2002. Afa, a diffuse adherence fibrillar adhesin associated with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **70**(5): 2681-9.

Kenny, B., L.-C. Lai, B. B. Finlay and M. S. Donnenberg 1996. EspA, a protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli*, is required to induce signals in epithelial cells. *Mol Microbiol* **20**: 313-23.

Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey and B. B. Finlay 1997b. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-20.

Knutton, S., T. Baldini, J. B. Kapper and A. S. McNeish 1987b. Role of plasmid-encoded adherence factors in adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *Infect Immun* **55**: 78-85.

Kovach, M. E., M. D. Shaffer and K. M. Peterson 1996. A putative integrase gene defines the distal end of a large cluster of ToxR-regulated colonization genes in *Vibrio cholerae*. *Microbiology* **142**(Pt 8): 2165-74.

Lai, L. C., L. A. Wainwright, K. D. Stone and M. S. Donnenberg 1997. A third secreted protein that is encoded by the enteropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity island is required for transduction of signals and for attaching and effacing activities in host cells. *Infect Immun* **65**(6): 2211-7.

Mansfield, K. G., K. C. Lin, D. Xia, J. V. Newman, D. B. Schauer, J. MacKey, A. A. Lackner and A. Carville 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* and Ulcerative Colitis in Cotton-Top Tamarins (*Saguinus oedipus*). *J Infect Dis* **184**(6): 803-7.

McDaniel, T. K., K. G. Jarvis, M. S. Donnenberg and J. B. Kaper 1995. A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens. *Proc Natl Acad Sci USA* **92**(5): 1664-8.

McDaniel, T. K. and J. B. Kaper 1997. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K-12. *Mol Microbiol* **23**(2): 399-407.

McNamara, B. P., A. Koutsouris, C. B. O'Connell, J. P. Nougayrede, M. S. Donnenberg and G. Hecht 2001. Translocated EspF protein from enteropathogenic *Escherichia coli* disrupts host intestinal barrier function. *J Clin Invest* **107**(5): 621-9.

Mellies, J. L., F. Navarro-Garcia, I. Okeke, J. Frederickson, J. P. Nataro and J. B. Kaper 2001. EspC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun* **69**(1): 315-24.

Moxley, R. A. and D. H. Francis 1986. Natural and experimental infection with an attaching and effacing strain of *Escherichia coli* in calves. *Infect Immun* **53**: 339-46.

Nataro, J. P. and J. B. Kaper 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**(1): 142-201.

Ohnishi, M., K. Kurokawa and T. Hayashi 2001. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol* **9**(10): 481-5.

Oswald, E., H. Schmidt, S. Morabito, H. Karch, O. Marches and A. Caprioli 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect Immun* **68**(1): 64-71.

Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamosis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch and F. R. Blattner 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature* **409**(6819): 529-33.

Peterson, K. M. and J. J. Mekalanos 1988. Characterization of the *Vibrio cholerae* ToxR regulon: identification of novel genes involved in intestinal colonization. *Infect Immun* **56**(11): 2822-9.

Plotkowski, M. C., A. O. Costa, V. Morandi, H. S. Barbosa, H. B. Nader, S. de Bentzmann and E. Puchelle 2001. Role of heparan sulphate proteoglycans as

potential receptors for non-piliated *Pseudomonas aeruginosa* adherence to non-polarised airway epithelial cells. J Med Microbiol **50**(2): 183-90.

Rostand, K. S. and J. D. Esko 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. Infect Immun **65**(1): 1-8.

Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis 1989. Molecular cloning : a laboratory manual, 2nd ed. New York.

Sperandio, V., J. B. Kaper, M. R. Bortolini, B. C. Neves, R. Keller and L. R. Trabulsi 1998. Characterization of the locus of enterocyte effacement (LEE) in different enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Shiga-toxin producing *Escherichia coli* (STEC) serotypes. FEMS Microbiol Lett **164**(1): 133-9.

Stevens, M. P., P. M. van Diemen, G. Frankel, A. D. Phillips and T. S. Wallis 2002. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. Infect Immun **70**(9): 5158-66.

Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor and T. E. Besser 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. Infect Immun **68**(3): 1400-7.

Tatsuno, I., M. Horie, H. Abe, T. Miki, K. Makino, H. Shinagawa, H. Taguchi, S. Kamiya, T. Hayashi and C. Sasakawa 2001. *tox*B gene on pO157 of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is required for full epithelial cell adherence phenotype. Infect Immun **69**(11): 6660-9.

Taylor, K. A., C. B. O'Connell, P. W. Luther and M. S. Donnenberg 1998. The EsB protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is targeted to the cytoplasm of infected HeLa cells. Infect Immun **66**(11): 5501-07.

Taylor, R. K., V. L. Miller, D. B. Furlong and J. J. Mekalanos 1987. Use of *phoA* gene fusions to identify a pilus colonization factor coordinately regulated with cholera toxin. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**(9): 2833-7.

Tobe, T., I. Tatsuno, E. Katayama, C.-Y. Wu, G. K. Schoolnik and C. Sasakawa 1999. A novel chromosomal locus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), which encodes a *bfpT*-regulated chaperone-like protein, TrcA, involved in microcolony formation by EPEC. *Mol Microbiol* **33**(4): 741-52.

Tzipori, S., R. Gibson and J. Montanaro 1989. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. *Infect Immun* **57**(4): 1142-50.

von Heijne, G. 1986. A new method for predicting signal sequence cleavage sites. *Nucleic acid research* **14**: 4683-90.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques, C. Desautels, M. S. Donnenberg, M. Beaudry and J. M. Fairbrother 1994. Virulence properties and attaching-effacing activity of *Escherichia coli* O45 from swine postweaning diarrhea. *Infect Immun* **62**(10): 4153-9.

Zhu, C., J. Harel, M. Jacques and J. M. Fairbrother 1995b. Interaction with pig ileal explants of *Escherichia coli* O45 isolates from swine with postweaning diarrhea. *Can J Vet Res* **59**: 118-23.

Zhu, C., S. Ménard, J. D. Dubreuil and J. M. Fairbrother 1996. Detection and localization of the EaeA protein of attaching and effacing *Escherichia coli* O45 from pigs using a monoclonal antibody. *Microbial Pathog* **21**: 205-13.

Contribution des auteurs à la réalisation de l'article 4

Isabelle Batisson : a réalisé, en partie, l'étude bio-informatique du gène *paa*, a réalisé la protéine de fusion His-Paa, a participé à la production des anticorps anti-Paa, et a participé à l'écriture du manuscrit.

Marie-Pierre Guimond : a participé à l'étude bio-informatique du gène *paa*, à la réalisation des divers mutants utilisés dans cet article, et à l'écriture du manuscrit.

Francis Girard : a participé à la caractérisation du rôle de Paa en IVOC, à participé à la production des anticorps anti-Paa, a réalisé la complémentation du gène *paa* dans la souche E22, a effectué les analyses microscopiques, et a participé à l'écriture du manuscrit.

Hongyan An : a découvert et procédé à la caractérisation initiale du gène *paa*.

Chengru Zhu : a participé à la caractérisation en IVOC de Paa, et a réalisé les expériences *in vivo*.

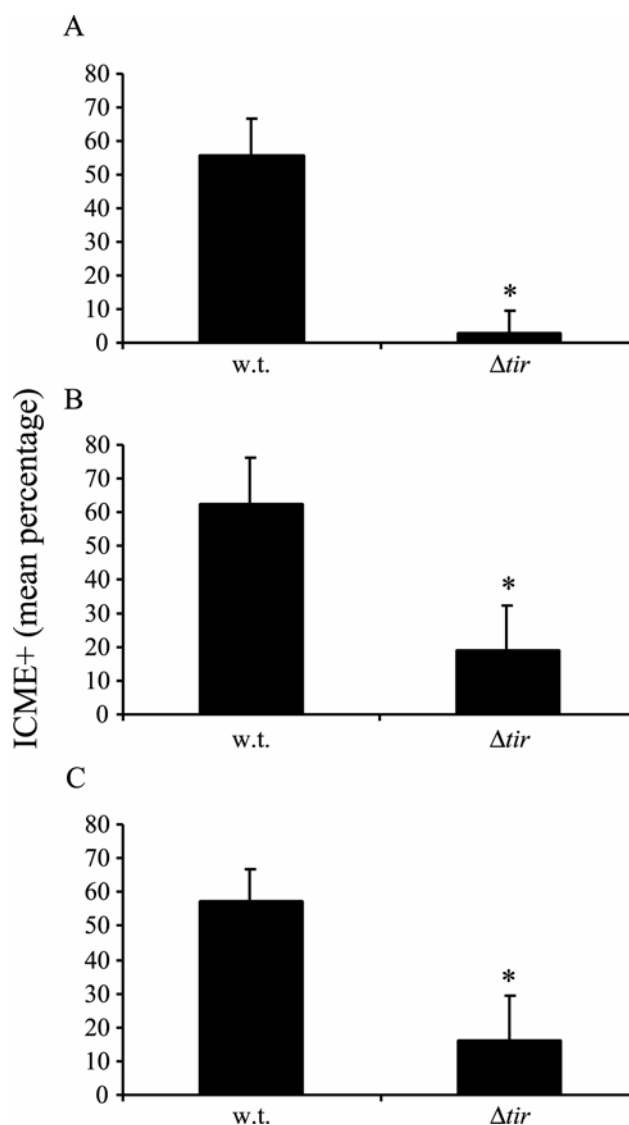
Eric Oswald : a réalisé le mutant E22 Δ *paa* et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

John M. Fairbrother : a supervisé les travaux d'Isabelle Batisson, Francis Girard et Chengru Zhu, et a orienté l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections apportées au manuscrit.

Mario Jacques : a supervisé les expériences initiales de microscopie électronique, et a contribué par ses conseils et lecture critique du manuscrit.

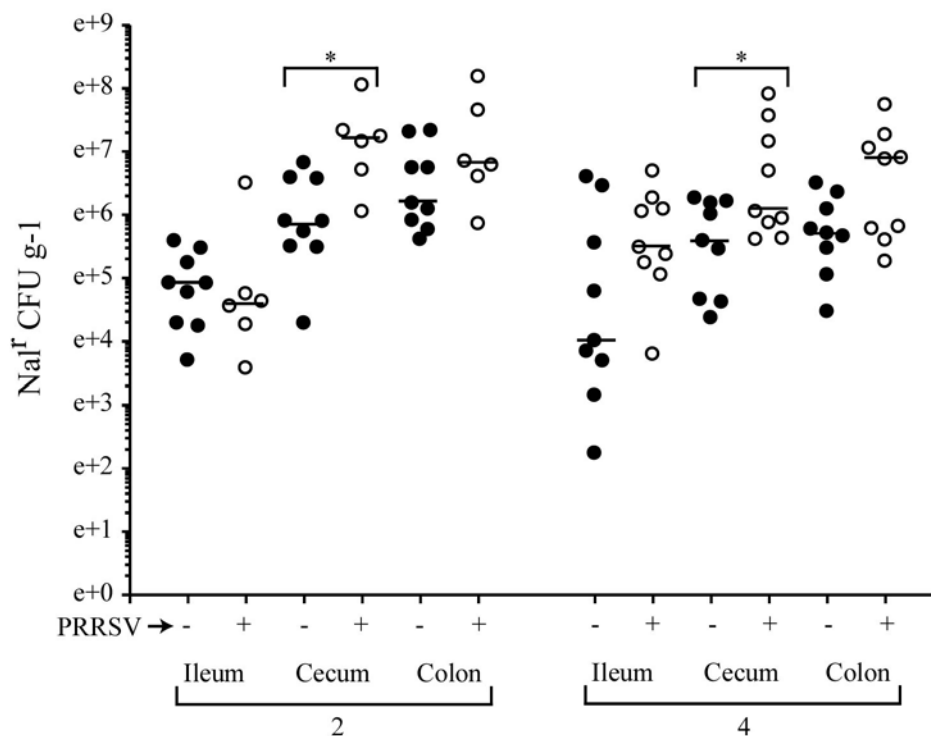
Josée Harel : a supervisé les travaux d'Isabelle Batisson, Marie-Pierre Guimond et Hongyan An, et a orienté l'écriture du manuscrit par ses conseils et corrections apportées au manuscrit.

DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 1



Article 1, figure complémentaire 1. A complete *tir* deletion in human EPEC strain E2348/69 resulted in a significantly lower (*, $P < 0.0001$) mean percentage of inter-crypt mucosal epithelium with bacterial adherence per examined explant in the duodenum (A), jejunum (B), and ileum (C), compared to the wild-type strain ex vivo. Results are presented as the mean $\pm$ the standard deviation of the mean, and $P < 0.05$ was taken to be significant.

DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 2



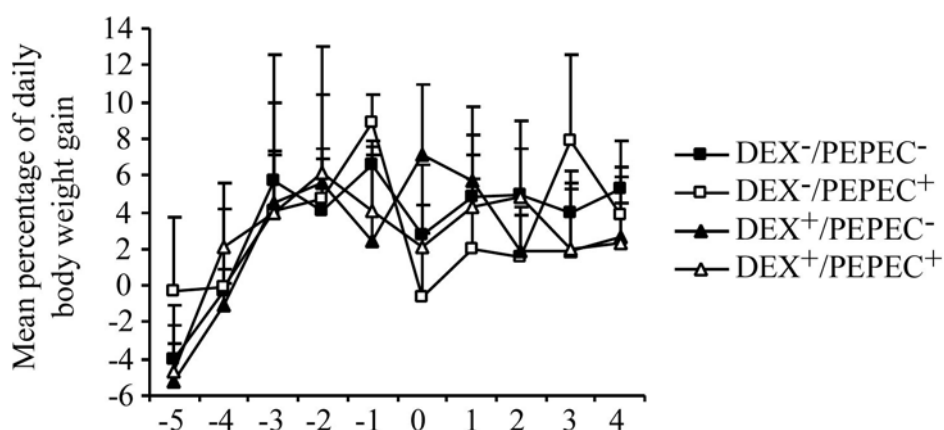
Article 2, figure complémentaire 1. Colonization of nalidixic-acid resistant bacteria in the ileum, cecum and colon of PRRSV-positive (+) and PRRSV-negative (-) pigs experimentally challenged with the PEPEC strains ECL1001 and ECL1015. Significant differences were observed between the cecal counts of PRRSV-negative and PRRSV-positive pigs at day 2 (2, $P=0.0048$) and day 4 (4, $P=0.035$). Results are presented as raw data with the horizontal bar as the median. A $P<0.05$ was taken to be statistically significant.

Article 2, tableau complémentaire I: Prevalence of A/E lesions in PRRSV-negative and PRRSV-positive pigs challenged with PEPEC strains ECL1001 and ECL1015

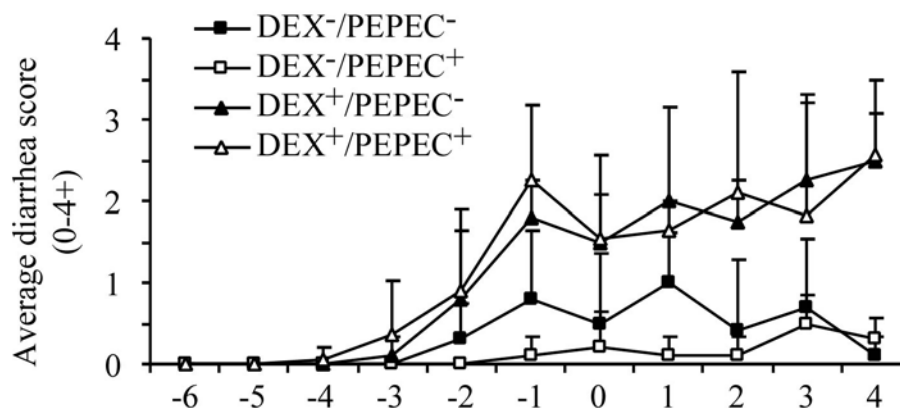
Status of pigs at time of challenge	Day after challenge	Number of pigs (%)		Median percentage of ICME with A/E bacteria, in the large intestine ^a
		Total	A/E+	
PRRSV-negative	2	9	2 (22.2)	1.34
	4	9	1 (11.1)	4.63
PRRSV-positive*	2	6	5 (83.3)	4.15
	4	9	7 (77.8)	6.3

* PRRSV-positive pigs showed an overall increase in the prevalence of A/E lesions ($P=0.004$) compared to PRRSV-negative pigs

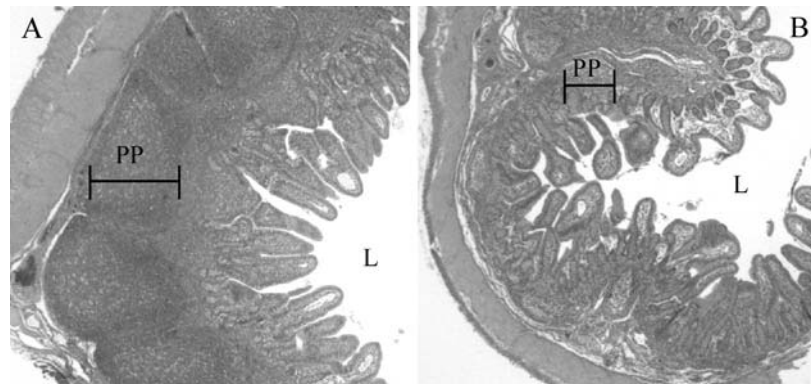
^a Cecum and colon were grouped as “large intestine”.



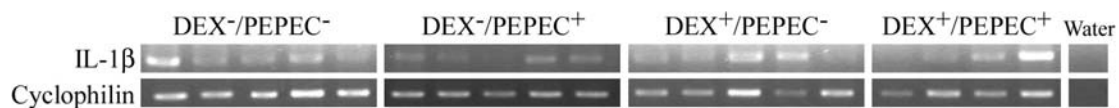
Article 2, figure complémentaire 2. Mean percentage of daily body weight gain of weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 (PEPEC⁺) following no treatment (DEX⁻), or following treatment with dexamethasone (DEX⁺) at a daily dosage of 3 mg kg⁻¹. DEX⁻/PEPEC⁻ pigs were used as control, and the X-axis represents days of the experimental procedure, and day 0 is the day of first challenge. DEX⁺ pigs received dexamethasone from day -3 to 3, and PEPEC⁺ pigs were challenged from day 0 to 3. Necropsy was performed on day 4 for all pigs used in this study.



Article 2, figure complémentaire 3. Average diarrhea score of weaned pigs challenged with the PEPEC strain ECL1001 (PEPEC⁺) following no treatment (DEX), or following treatment with dexamethasone (DEX⁺) at a daily dosage of 3 mg kg⁻¹. DEX-/PEPEC⁻ pigs were used as control, and the X-axis represent days of the experimental procedure. DEX⁺ pigs receive dexamethasone from day -3 to 3, and PEPEC⁺ pigs were challenged from day 0 to day 3. Necropsy was performed on day 4 for all pigs used in this study.

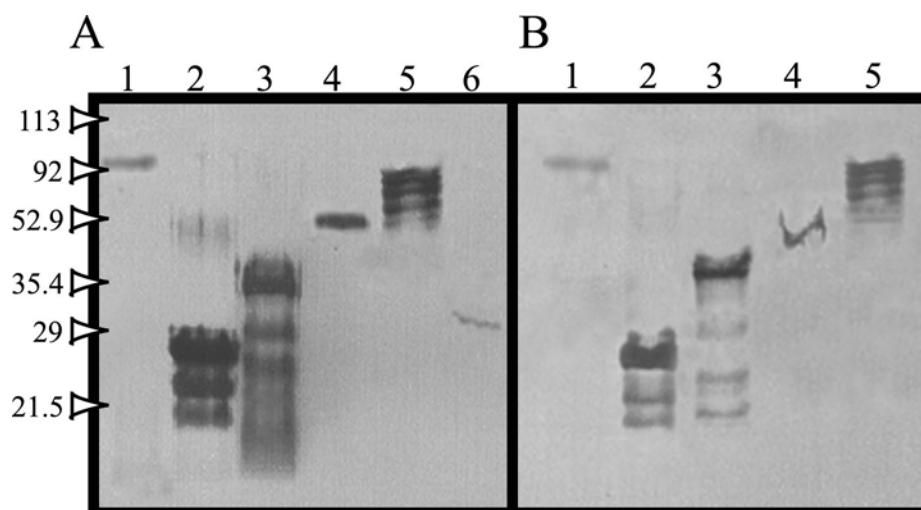


Article 2, figure complémentaire 4. Dexamethasone exerts significant reduction of the relative size of ileal Peyer's patches (PP) in weaned pigs. Micrograph A (Magnification, x2.5) shows normal PP from a representative HPS-stained section of a DEX⁻/PEPEC⁺ pig, whereas micrograph B (Magnification, x2.5) shows barely-absent PP from a representative HPS-stained section of a DEX⁺/PEPEC⁺ pig. Similar results were observed in DEX⁻/PEPEC⁻, and DEX⁺/PEPEC⁻ pigs, respectively. L = intestinal lumen.

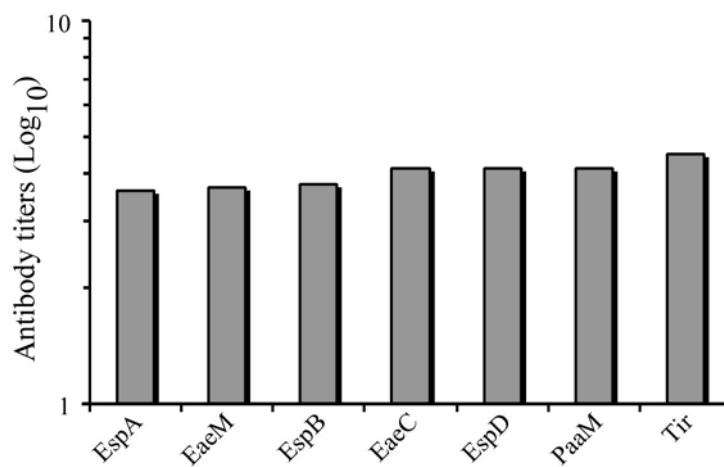


Article 2, figure complémentaire 5. Expression of IL-1 β in Peyer's patch-containing ileum segments. The changes in band intensities for each treatment (n=5, n=4 for DEX⁺/PEPEC⁺) were quantified by densitometric analysis by using the ratio of the band intensity of the cytokine-specific RT-PCR product as the integrated area (pixels) over that of the corresponding constitutively expressed "house-keeping" gene, cyclophilin. Each band represents a pig, and the "water" results were obtained by replacing the cDNA by water during PCR amplification.

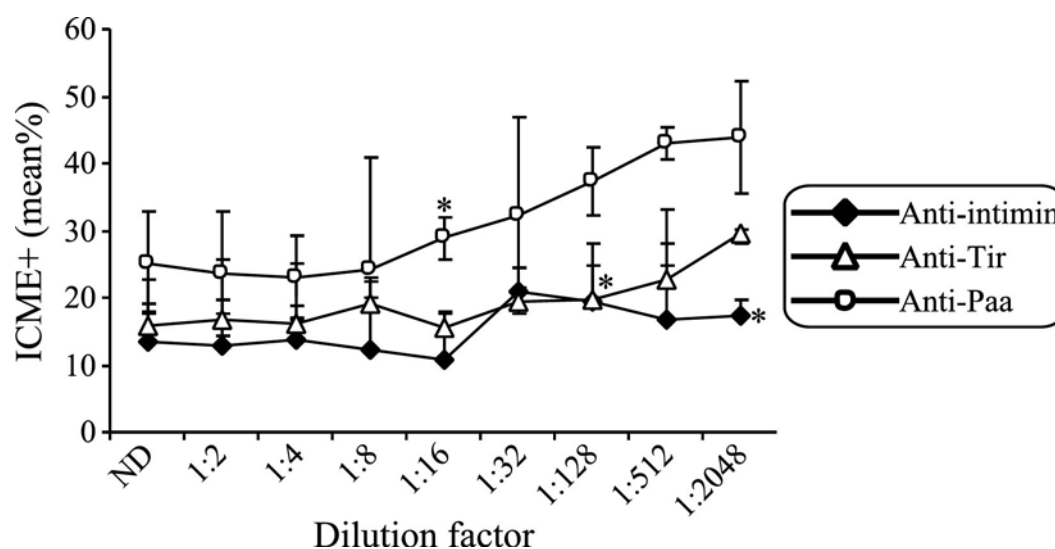
DONNÉES COMPLÉMENTAIRES, ARTICLE 3



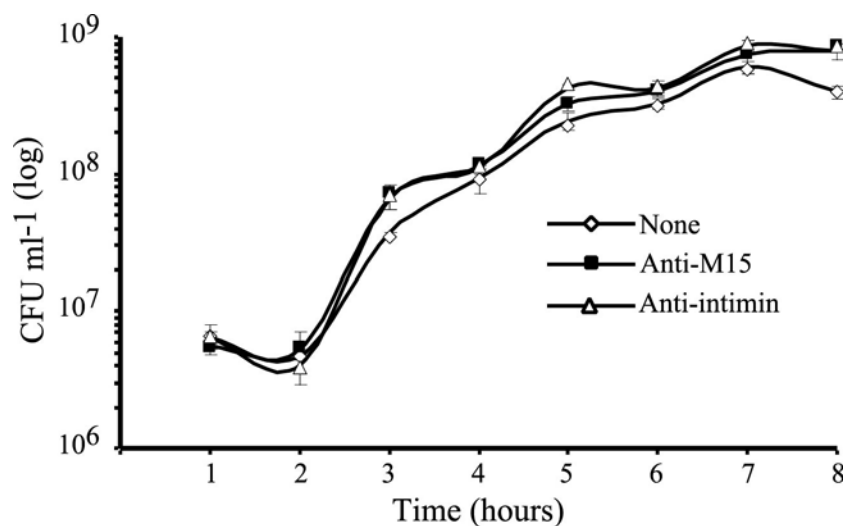
Article 3, figure complémentaire 1. Western blot analysis of the His A/E virulence factor hybrid proteins using antibodies directed against RGS-His marker (A) and the appropriate virulence factor (B). Lane 1: His-intimin protein, lane 2: His-EspA protein, lane 3: His-EspB protein, lane 4: His-EspD protein, lane 5: His-Tir protein, and lane 6: His-Paa protein. Lane 6 is absent from the anti-factor western blot (B) since no antibodies directed against Paa protein were available prior to immunization. Molecular weight markers on the left hand side are in kDa.



Article 3, figure complémentaire 2. Titer of the different antiserum raised in this study. All titers are expressed in Log₁₀.



Article 3, figure complémentaire 3. Effect of serial dilution of anti-Intimin (◆), anti-Tir (△), and anti-Paa (○) antibodies on the mean percentage of ICME showing intimate adherence in porcine ileal IVOC segments inoculated with the PEPEC strain ECL1001. Serial dilutions of antibody preparations were incubated with bacteria for 30 minutes at 37°C before inoculation of ileal segments. Results, shown as the mean $\pm$ the SD of the mean, were obtained from quantification of bacterial adherence on HPS-stained sections. (*) represents the dilution above which the result was considered as significantly ($P < 0.05$) different from the non-diluted (ND) value for that antiserum.



Article 3, figure complémentaire 4. Neither anti-intimin ($\triangle$) antibodies, nor control antibodies (Anti-M15, $\blacksquare$) inhibited the growth rate of the PEPEC strain ECL1001 NaI^r as compared to growth of the strain in the absence of antibodies (None, $\diamond$) in culture conditions. Data presented are the combination of three independent experiments and are shown as the mean $\pm$ the SD of the mean.