

INRS-Institut Armand-Frappier

Identification, caractérisation et distribution phylogénétique du fimbriae IR  
chez *Escherichia coli*

Par

Maria Lymberopoulos

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.) en  
microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

|                                             |                                                                          |
|---------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------|
| Président du jury<br>et examinateur interne | Rolf Morosoli, INRS-Institut Armand-Frappier                             |
| Examineur externe                           | Josée Harel<br>Faculté de médecine vétérinaire<br>Université de Montréal |
| Directeur de recherche                      | Charles Dozois, INRS-Institut Armand-Frappier                            |



## Résumé

*Escherichia coli* est une bactérie qui fait partie de la flore normale de la majorité des animaux. Par contre, plusieurs souches sont capables de causer des maladies, nommées colibacilloses, chez différents hôtes. Les *E. coli* pathogènes sont responsables d'une variété d'infections intestinales et extra-intestinales. Les infections causées par *E. coli* sont responsables de grandes pertes économiques pour l'industrie avicole. La dualité de cette bactérie, c'est-à-dire la présence de souches pathogènes et de souches non-pathogènes, nous permet d'identifier des facteurs de virulence qui permettent aux souches pathogènes de coloniser et se propager chez l'hôte.

Plusieurs gènes présents chez la souche *E. coli* pathogène aviaire  $\chi$ 7122 (O78: K80: H9) et qui ne se retrouvent pas chez la souche *E. coli* K-12  $\chi$ 289, des gènes dits pathogène spécifiques, sont transcrits *in vivo* dans des tissus de poulets lors de l'infection (36). Six des séquences, nommées *ecs*, ont été choisies afin de vérifier la présence de celles-ci chez une variété de souches de *E. coli*. La méthode du PCR multiplex a été choisie à cause de sa rapidité, sa simplicité d'utilisation ainsi que sa spécificité. Une de ces séquences, ayant de l'homologie avec plusieurs gènes codant pour des « ushers » de fimbriae putatifs, a été choisie pour sa caractérisation antérieure. L'objectif de cette étude était de caractériser ce nouveau fimbriae et de déterminer sa prévalence parmi des souches de *E. coli* provenant d'une variété de sources et causant diverses maladies.

La région génomique contenant cette séquence a été séquencée à l'aide du transposon Tn5seq1. Un groupe de quatre gènes putatifs démontrant de l'homologie avec plusieurs opérons fimbriaires a été identifié. Ce groupe de gènes, nommé *irfABCD* pour « iron-regulated fimbriae », était homologue aux « long polar fimbriae » (LPF) de *S. typhimurium* et de *E. coli* O157:H7 ainsi que Lpf<sub>O113</sub> identifié chez *E. coli* O113:H- (7, 33, 159). *irf* semble faire partie d'un groupe distinct de gènes fimbriaires localisés dans la région intergénique entre les gènes conservés *glmS* et *psiS*. Dans le même groupe on retrouve *lpf<sub>O113</sub>*, *stg* de *Salmonella enterica* serovar Typhi et l'îlot 154 de la souche EDL933 de *E. coli* O157:H7. Les séquences *irf* sont distribuées de manière phylogénétique parmi les souches de la collection ECOR et des souches provenant d'infections du tractus urinaire. On retrouve surtout les séquences *irf* dans les souches des

groupes phylogénétiques B1 et D et ces séquences ne se retrouvent jamais dans les souches faisant partie du groupe phylogénétique B2. De plus, *irf* est associé aux souches APEC plutôt qu'aux souches provenant des fèces de poulets sains et ces séquences sont fréquemment retrouvées chez les souches APEC de sérotype O78. La présence des séquences *irf* ont contribué à l'adhérence de la souche ORN103, qui normalement ne produit pas de fimbriae, à des cellules épithéliales humaines de la vessie et de l'intestin. Cette même souche contenant *irfABCD* était plus adhérente à des tissus aviaires du poumon et de la trachée que celle-ci sans ces séquences. Sous le contrôle du promoteur pBAD, les fimbriae Irf ont été visualisés par microscopie électronique. Des essais de régulation transcriptionnelle ont démontré que l'expression de *irf* est supérieure dans un milieu minimal et que la source de carbone peut jouer un rôle dans son expression. En plus, la quantité de fer ainsi que le régulateur global Fur semble affecter la régulation de l'expression de *irf*.



Étudiante



Directeur de recherche

## Remerciements

Premièrement, je voudrais remercier mon directeur de recherche Dr. Charles Dozois pour ses conseils, son support et sa disponibilité lors de mes travaux. De plus, merci de m'avoir donné la chance de participer à deux congrès scientifiques lors de ma maîtrise. Je remercie Robert Alain pour son aide technique pour la microscopie électronique et Marcel Desrosiers pour son aide avec les photos de microscopie optique. Je suis reconnaissante à France Daigle qui m'a accueillie dans son laboratoire et m'a guidée lors de mes expériences d'adhésion cellulaire. Merci aussi à Isabelle Gaucher et Sébastien Faucher pour leur aide avec ces expériences. Mes remerciements à Maryvonne Moulin-Schoule et son équipe de recherche ainsi qu'à James R. Johnson pour leur collaboration aux travaux inclus dans l'article. À mes collègues Mélissa Caza et Simon Léveillé, merci pour votre aide et vos conseils. Merci à mon frère Leonidas Lymberopoulos et ma belle soeur Chrisoula Hatzis pour leur aide professionnelle avec la photographie numérique ainsi que pour leur emprunt de l'ordinateur portable.

J'aimerais remercier la Fondation Armand-Frappier pour le support financier lors de mes travaux et ainsi que pour la bourse congrès hors-Québec qu'ils m'ont attribué.

I am eternally grateful to my mother Dialekti Makridou who is always supportive and who has sacrificed so much so that we can have everything that we need. Thank you for making the years of my studies so much easier and for your helpful thoughts always. To my brother, who was not only my technical support during all my years of schooling, but who also guided me and gave me helpful advice through many of life's choices, I am forever grateful. Thanks to my father Apostolos Lymberopoulos for his generosity and his support.

Merci à vous tous,

Maria Lymberopoulos

## Table des matières

|                                                                             |          |
|-----------------------------------------------------------------------------|----------|
| Résumé.....                                                                 | ii       |
| Remerciements.....                                                          | iv       |
| Table des matières.....                                                     | v        |
| Liste des figures.....                                                      | ix       |
| Liste des tableaux.....                                                     | x        |
| Liste des abréviations.....                                                 | xi       |
| Introduction.....                                                           | 1        |
| <br>                                                                        |          |
| <b>Chapitre 1 : Revue de littérature.....</b>                               | <b>5</b> |
| 1.1 <i>Escherichia coli</i> .....                                           | 5        |
| 1.2 Classification sérologique de <i>E. coli</i> .....                      | 5        |
| 1.2.1 Antigènes O.....                                                      | 6        |
| 1.2.2 Antigènes K.....                                                      | 7        |
| 1.2.3 Antigènes H.....                                                      | 8        |
| 1.2.4 Antigènes F.....                                                      | 8        |
| 1.3 La diversité de <i>Escherichia coli</i> .....                           | 8        |
| 1.3.1 Infections intestinales.....                                          | 9        |
| 1.3.2 Infections extra-intestinales.....                                    | 10       |
| 1.4 Génomes des souches de <i>Escherichia coli</i> .....                    | 12       |
| 1.4.1 L'acquisition de gènes de virulence.....                              | 13       |
| 1.4.2 Clonalité et groupes phylogénétiques de <i>Escherichia coli</i> ..... | 13       |
| 1.5 <i>Escherichia coli</i> pathogène aviaire (APEC).....                   | 14       |
| 1.5.1 Infection du système respiratoire aviaire.....                        | 15       |
| 1.6 Facteurs de virulence chez <i>E. coli</i> pathogène aviaire.....        | 15       |
| 1.6.1 Antigène K.....                                                       | 16       |
| 1.6.2 Systèmes de séquestration de fer.....                                 | 17       |
| 1.6.3 Résistance au sérum.....                                              | 18       |
| 1.6.4 Toxines.....                                                          | 18       |
| 1.6.5 Fimbriae de type 1.....                                               | 19       |

|                                                                                                                                                                             |           |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1.6.6 Fimbriae P.....                                                                                                                                                       | 20        |
| 1.6.7 Tsh.....                                                                                                                                                              | 20        |
| 1.6.8 Curli.....                                                                                                                                                            | 21        |
| 1.6.9 Fimbriae AC/1.....                                                                                                                                                    | 22        |
| 1.6.10 Flagelles.....                                                                                                                                                       | 22        |
| 1.7 Recherche de séquences pathogène-spécifiques chez APEC.....                                                                                                             | 22        |
| 1.8 Fimbriae.....                                                                                                                                                           | 23        |
| 1.8.1 Organisation, structure et assemblage des fimbriae.....                                                                                                               | 24        |
| 1.8.2 Voie du « chaperone-usheer ».....                                                                                                                                     | 25        |
| 1.8.3 Famille des fimbriae LP.....                                                                                                                                          | 28        |
| 1.9 Régulation des gènes de virulence.....                                                                                                                                  | 30        |
| 1.9.1 Facteurs environnementaux.....                                                                                                                                        | 31        |
| 1.9.1.1 Le fer.....                                                                                                                                                         | 31        |
| 1.9.2 Régulateurs globaux.....                                                                                                                                              | 31        |
| 1.9.2.1 La régulateur global Fur.....                                                                                                                                       | 32        |
| 1.9.3 Régulation de l'expression des fimbriae.....                                                                                                                          | 34        |
| 1.9.3.1 Variation de phase des fimbriae P.....                                                                                                                              | 34        |
| 1.9.3.2 Variation de phase des fimbriae de type 1.....                                                                                                                      | 36        |
| <b>Chapitre 2 : Résultats préalables.....</b>                                                                                                                               | <b>38</b> |
| 2.1 PCR multiplex de six clones <i>ecs</i> .....                                                                                                                            | 38        |
| 2.2 Conclusion.....                                                                                                                                                         | 44        |
| <b>Chapitre 3 : Article scientifique.....</b>                                                                                                                               | <b>45</b> |
| 3.1 Contribution des auteurs à l'article.....                                                                                                                               | 45        |
| 3.2 Article: Characterization of an iron-regulated (IR) fimbrial adhesin,<br>and distribution among <i>Escherichia coli</i> clinical isolates<br>and reference strains..... | 46        |
| 3.2.1 Abstract.....                                                                                                                                                         | 47        |
| 3.2.2 Introduction.....                                                                                                                                                     | 48        |
| 3.2.3 Materials and methods.....                                                                                                                                            | 50        |

|                                                                                                                                                            |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.3.1 Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions....                                                                                       | 50 |
| 3.2.3.2 DNA and genetic manipulations.....                                                                                                                 | 51 |
| 3.2.3.3 Identification, cloning and sequencing of the<br><i>irf</i> gene cluster.....                                                                      | 51 |
| 3.2.3.4 Distribution of the <i>irf</i> operon among <i>E. coli</i> strains.....                                                                            | 52 |
| 3.2.3.5 Bacterial association with human epithelial cells.....                                                                                             | 52 |
| 3.2.3.6 Adherence assays to chicken tracheal and lung<br>frozen sections.....                                                                              | 53 |
| 3.2.3.7 Electron microscopy.....                                                                                                                           | 53 |
| 3.2.3.8 Construction of <i>lacZ</i> YA mutants of strains<br>$\chi$ 7122 and $\chi$ 289.....                                                               | 54 |
| 3.2.3.9 Measurement of $\beta$ -galactosidase activity.....                                                                                                | 54 |
| 3.2.3.10 Nucleotide sequence accession number.....                                                                                                         | 55 |
| 3.2.4 Results.....                                                                                                                                         | 55 |
| 3.2.4.1 Identification of the <i>irfABCD</i> gene cluster and<br>phylogenetic relationship with other fimbrial<br>gene clusters.....                       | 55 |
| 3.2.4.2 Distribution of <i>irfC</i> among the ECOR collection,<br><i>E. coli</i> isolates from urinary tract infections, and<br>avian <i>E. coli</i> ..... | 57 |
| 3.2.4.3 Contribution of <i>irf</i> genes to adherence of <i>E. coli</i> to<br>UM-UC-3 and INT407 epithelial cells.....                                     | 58 |
| 3.2.4.4 Adherence to chicken tracheal and lung tissues.....                                                                                                | 59 |
| 3.2.4.5 Visualisation of IR fimbriae by induced expression<br>in strain ORN172.....                                                                        | 59 |
| 3.2.4.6 Transcription of the <i>irf</i> operon is regulated by carbon<br>source and iron.....                                                              | 60 |
| 3.2.5 Discussion.....                                                                                                                                      | 61 |
| 3.2.6 Acknowledgements.....                                                                                                                                | 66 |
| 3.2.7 References.....                                                                                                                                      | 67 |
| 3.2.8 Tables.....                                                                                                                                          | 75 |



|                                               |           |
|-----------------------------------------------|-----------|
| 3.2.9 Figures.....                            | 79        |
| 3.3 Accusé de réception.....                  | 86        |
| <b>Chapitre 4 : Discussion.....</b>           | <b>87</b> |
| 4.1 Perspectives.....                         | 95        |
| <b>Chapitre 5 : Conclusion.....</b>           | <b>97</b> |
| <b>Chapitre 6 : Liste des références.....</b> | <b>98</b> |

## Liste des figures

### Revue de littérature

|            |                                                                                               |    |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 1.1 | Arbre phylogénétique des isolats ECOR.                                                        | 7  |
| Figure 1.2 | Facteurs de virulence chez les <i>E. coli</i> extra-intestinaux.                              | 16 |
| Figure 1.3 | Opérons qui codent pour les fimbriae P et type 1 des souches de <i>E. coli</i> uropathogènes. | 25 |
| Figure 1.4 | Développement, structure et fonction des fimbriae P.                                          | 27 |
| Figure 1.5 | Représentation de la structure cristalline des peptides PapD et PapK.                         | 28 |
| Figure 1.6 | Représentation schématique de la répression génique médiée par Fur.                           | 32 |
| Figure 1.7 | Modèle d'interaction entre Fur et RyhB pour réguler l'utilisation du fer.                     | 33 |
| Figure 1.8 | Le modèle de variation de phase de Pap.                                                       | 35 |
| Figure 1.9 | Le modèle de variation de phase des fimbriae de type 1.                                       | 37 |

### Résultats préalables

|            |                                                  |    |
|------------|--------------------------------------------------|----|
| Figure 2.1 | Réactions de PCR multiplex sur gel d'agarose 2%. | 42 |
|------------|--------------------------------------------------|----|

### Article

|            |                                                                                                              |    |
|------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figure 3.1 | Genetic organization of fimbrial gene clusters.                                                              | 79 |
| Figure 3.2 | Bacterial adherence assays using UM-UC-3 and INT407 epithelial cells.                                        | 81 |
| Figure 3.3 | Adherence assays of <i>E. coli</i> ORN103(pIJ2) and ORN103(pCR-XL-TOPO) to INT407 cells.                     | 82 |
| Figure 3.4 | Adherence of ORN103(pIJ2) and ORN103(pCR-XL-TOPO) to chicken lung sections.                                  | 83 |
| Figure 3.5 | Expression of IR fimbriae on the surface of ORN172(pIJ39) as visualized by transmission electron microscopy. | 84 |
| Figure 3.6 | $\beta$ -galactosidase production by <i>E. coli</i> strains.                                                 | 85 |

## Liste des tableaux

### Revue de littérature

|             |                                                                                                                     |    |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 1.1 | Sérogroupe O d' <i>Escherichia coli</i> associés avec les fèces normaux et de diverses infections chez les humains. | 12 |
|-------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|

### Résultats préliminaires

|             |                                                                                                                                    |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tableau 2.1 | Souches de <i>E. coli</i> provenant de différents contextes cliniques, rassemblées en groupes pour les réactions de PCR multiplex. | 40 |
| Tableau 2.2 | Séquences des amorces spécifiques aux six clones <i>ecs</i> utilisées dans les réactions de PCR multiplex.                         | 41 |
| Tableau 2.3 | Résultats des PCR multiplex sur des groupes de souches de <i>E. coli</i> .                                                         | 43 |

### Article

|           |                                                                                                                                |    |
|-----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Table 3.1 | Bacterial strains and plasmids used in this study.                                                                             | 75 |
| Table 3.2 | Phylogenetic distribution of <i>irfC</i> among the ECOR collection and ExPEC isolates.                                         | 77 |
| Table 3.3 | Distribution of <i>irfC</i> within the lethality classes of avian pathogenic <i>E. coli</i> (APEC) and environmental isolates. | 78 |
| Table 3.4 | Association between the O serogroups of avian pathogenic <i>E. coli</i> strains (APEC) and the presence of <i>irfC</i> .       | 78 |

## Liste des abréviations

|       |                                                        |
|-------|--------------------------------------------------------|
| Aa    | acides aminés                                          |
| ADN   | acide désoxyribonucléique                              |
| APEC  | « avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> »           |
| ARN   | acide ribonucléique                                    |
| ARNm  | acide ribonucléique messenger                          |
| ColV  | colicine V                                             |
| Da    | Dalton                                                 |
| ECOR  | « <i>E. coli</i> reference collection »                |
| EHEC  | « enterohemorrhagic <i>E. coli</i> »                   |
| EIEC  | « enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> »             |
| EPEC  | « enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> »           |
| ETEC  | « enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> »            |
| ExPEC | « extraintestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> » |
| Fur   | « ferric-uptake regulator »                            |
| H-NS  | « histone-like nucleoid associated protein »           |
| IS    | « insertional sequence »                               |
| LEE   | « locus of enterocyte effacement »                     |
| LPS   | lipopolyssacharides                                    |
| LRP   | « leucine responsive regulatory protein »              |
| MLEE  | « multilocus enzyme electrophoresis »                  |
| MRHA  | « mannose-resistant hemagglutination »                 |
| OMP   | « outer membrane protein »                             |
| ORF   | « open reading frame »                                 |
| PAIs  | « pathogenicity islands »                              |
| PCR   | « polymerase chain reaction »                          |
| Pb    | paires de base                                         |
| REPEC | « rabbit-specific EPEC »                               |
| STEC  | « shiga toxin-producing <i>Escherichia coli</i> »      |
| UPEC  | « uropathogenic <i>Escherichia coli</i> »              |

|      |                                                |
|------|------------------------------------------------|
| UTI  | « urinary tract infection »                    |
| VTEC | « vero cytotoxigenic <i>Escherichia coli</i> » |



## Introduction

La première souche de *Escherichia coli* a été isolée de fèces d'enfants, et fût identifiée par un pédiatre Allemand nommé Theodor Escherich en 1885, où il l'avait nommée *Bacterium coli commune* (88). *E. coli* est une composante de la flore intestinale des animaux, et des humains. Un nouveau né est colonisé par cette bactérie dès les premières heures après sa naissance. Cette colonisation est bénéfique puisque *E. coli* peut fournir des métabolites à l'hôte et compétitionner avec d'autres microorganismes pour des nutriments et des sites d'attachement à l'hôte (14, 108). Il existe pourtant certaines souches de *E. coli*, couramment appelées *E. coli* pathogènes, qui sont responsables chez les humains et les animaux d'une variété de maladies, nommées colibacillooses. Il y a des souches qui causent des maladies intestinales et d'autres qui causent des maladies extra-intestinales.

Chez l'humain, le site le plus commun d'infection par *E. coli* est dans la voie gastro-intestinale dû à l'ingestion de pathogènes par la nourriture et l'eau (156). Les souches associées à différentes infections intestinales sont classées en plusieurs catégories selon les facteurs épidémiologiques ou cliniques des maladies qu'ils causent. Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont souvent associés avec la gastro-entérite infantile dans les pays développés (108). *E. coli* entérotoxigène (ETEC) est une cause majeure de diarrhée chez les enfants dans les pays en voie de développement et chez les personnes qui y voyagent. *E. coli* enterohémorragique (EHEC) est associé avec la diarrhée, le syndrome hémolytique urémique (HUS) ainsi que la colite hémorragique. *E. coli* entéroinvasif (EIEC) est responsable de la dysenterie (108, 156).

Les souches de *E. coli* causant des infections extra-intestinales sont couramment appelées *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC). *E. coli* est responsable de plus de 90% des infections du tractus urinaire (UTI) chez l'humain (108). Les symptômes cliniques des UTI varient d'une bactériurémie asymptomatique à une cystite ou une pyélonéphrite qui peuvent devenir chroniques. De plus, certains individus peuvent développer une cicatrisation ou même une insuffisance rénale. Les UTI sont plus communes chez les femmes à cause de la longueur plus courte de leur urètre, ce qui facilite la progression des bactéries dans le tractus urinaire. Un autre groupe de souches

inclues dans les ExPEC sont les *E. coli* causant la méningite néonatale (NMEC). *E. coli* est aussi une cause commune de méningite chez les adultes (156).

Les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) sont surtout associés avec des maladies extra-intestinales chez la volaille, tels que des infections du système respiratoire ou des infections systémiques. La colibacillose est une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les poulets et les dindes et est responsable de pertes économiques significatives pour l'industrie avicole (31). La forme la plus commune de colibacillose aviaire est une infection respiratoire initiale nommée aérosacculite, qui est généralement suivie d'infections généralisées tels que la périhépatite, la péricardite ou la septicémie (31). L'infection du système respiratoire est souvent initiée ou accentuée soit par des facteurs biologiques tels que le virus de la maladie du Newcastle (NDV) ou des Mycoplasmes, soit par des facteurs physiques tels que l'exposition à l'ammoniac ou du stress due à des mauvaises conditions de confinement. L'infection de la voie respiratoire chez le poulet se fait souvent par l'inhalation de poussières contaminées par des fèces (56). Les sérogroupes les plus communs des APEC sont O1, O2 et O78 (31). Parce que *E. coli* est une grande cause d'infection chez les animaux, le développement de stratégies pour réduire l'incidence et la sévérité des maladies est une priorité (106). Des vaccins commerciaux pour la prévention des infections par ETEC chez les porcs, les agneaux et les veaux sont disponibles, mais d'autres stratégies de gestion doivent être employées afin de prévenir la maladie, tel que l'amélioration des conditions sanitaires et l'utilisation d'antibiotiques (67).

Les bactéries pathogènes possèdent divers facteurs de virulence qui leur permettent de coloniser, de se propager, et de contrer les défenses de l'hôte. Il est intéressant de noter que le génome de plusieurs souches pathogènes de *E. coli* est plus large que ceux des souches commensales (12). Ceci est dû au fait que les souches pathogènes possèdent souvent des gènes supplémentaires ou des grands blocs d'ADN, nommés îlots de pathogénicité (PAIs), qui leur confèrent possiblement un avantage dans différents contextes d'infection. Chez les *E. coli* pathogènes aviaires, certains facteurs de virulence putatifs ont été identifiés tels que des adhésines, des systèmes de séquestration du fer, des toxines et des antigènes capsulaires ou de lipopolysaccharides (83). Par contre, les mécanismes pathogéniques utilisés par les souches APEC restent à être élucidés (31).



Le génome de la souche de *E. coli* K-12 MG1655 fût le premier à être séquencé en 1997 (17). Depuis le génome d'au moins 5 autres souches de *E. coli* a été séquencé et plusieurs autres le sont partiellement. La souche APEC  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9) est capable de causer l'aérossaculite et la septicémie chez les poulets (139). Puisque le génome de cette souche n'est pas encore séquencé et dans le but d'identifier de nouveaux facteurs de virulence chez APEC, Dozois *et al.* (36) ont utilisé la méthode de SCOTS (« selective capture of transcribed sequences ») afin d'identifier des séquences uniques à la souche  $\chi$ 7122, donc absentes d'une souche de *E. coli* K-12, qui sont exprimés *in vivo* dans des tissus de poulets infectés par cette bactérie. Les transcrits isolés, nommés « *E. coli* captured sequences » (*ecs*), correspondent à des gènes qui ont une variété de fonctions putatives déterminées par homologie de séquence, dont l'adhérence, la synthèse de lipopolysaccharides et la réponse au fer. Puisque les populations de *E. coli* ont une structure clonale (62, 168, 169) et que plusieurs infections causées par *E. coli* ont été associées à des clones spécifiques ou des groupes de clones reliés (4, 96, 107, 169), il est intéressant de déterminer la prévalence des séquences *ecs* parmi d'autres souches de *E. coli*.

En effet, le projet de recherche débuta par un criblage initial afin de détecter six de ces séquences *ecs* chez des souches de *E. coli* provenant de contextes cliniques divers. Puisqu'aucune de ces séquences était associée uniquement ou en majorité parmi des souches pathogènes, et que plusieurs souches possédaient la séquence *ecs*-3, on a poursuivi avec la caractérisation de cette dernière. Cette séquence est homologue à plusieurs séquences de « ushers » putatifs de fimbriae. On suppose que puisque des infections chez la volaille avec des mutants de la souche  $\chi$ 7122 pour les trois adhésines connues, type 1, *tsh* et curli, n'a pas atténué la souche de façon significative dans les tissus respiratoires (C. Dozois, résultats non-publiés), d'autres adhésines doivent être impliquées.

L'objectif de cette étude était d'identifier et de caractériser un nouveau facteur pathospécifique associé à des souches de *E. coli* pathogènes aviaires. Les buts précis de l'étude étaient donc de (i) déterminer s'il y a une association avec la présence des six séquences *ecs* et la virulence des souches de *E. coli*, (ii) déterminer la distribution de la séquence *ecs*-3 chez une diversité de souches de *E. coli*, (iii) séquencer la région

génétique contenant la séquence *ecs-3* et (iv) caractériser le produit de la région génétique contenant la séquence *ecs-3*.

La séquence *ecs-3* fait partie d'un groupe de gènes encodant des fimbriae putatifs, que nous avons nommés *irf* pour « iron-regulated fimbriae ». La prévalence des gènes *irf* a été déterminée par PCR et ces gènes sont répartis de façon phylogénétique parmi les souches de *E. coli*. *irf* est associé avec les souches APEC, surtout chez ceux du séro groupe O78. Des essais d'adhésion ont démontré que *irf* contribue à l'adhérence d'une souche de *E. coli* K-12 à des cellules épithéliales humaines ainsi qu'à des tissus respiratoires de poulet. La visualisation des fimbriae IR par microscopie électronique, sur une souche qui n'exprime normalement pas de fimbriae, a été réalisée sous le contrôle du promoteur pBAD. Des essais de régulation d'expression par une fusion du promoteur de *irfA* et *lacZYA* ont permis de déterminer que la source de carbone, le fer et le régulateur global Fur ont un effet sur l'expression de *irf*.

Ce mémoire est présenté sous forme de mémoire par article. Il est donc divisé en 6 chapitres selon les modalités et règles de présentation des mémoires et thèses à l'INRS. Le chapitre 1 est constitué d'une revue de littérature. Les travaux ayant été réalisés qui ne sont pas abordés dans l'article (chapitre 3) se retrouvent dans le chapitre 2. La discussion et la conclusion se retrouvent dans les chapitres 4 et 5 respectivement. Le chapitre 6 comprend la liste des références.

## Chapitre 1

### Revue de littérature

#### 1.1 *Escherichia coli*

L'habitat principal de la famille des Enterobacteriaceae est dans l'intestin des humains et des animaux, et le genre *Escherichia* est un membre typique de cette famille. Plusieurs autres genres font partie de cette famille dont *Salmonella*, *Citrobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Shigella* et *Hafnia*. Le genre *Shigella* est fortement apparenté à *Escherichia*, au point où les deux devraient être combinés mais la distinction est gardée à cause des aspects cliniques et épidémiologiques des différentes espèces (156). *Escherichia coli* est une bactérie Gram-négative anaérobie facultative. La première souche de *E. coli* a été identifiée par un pédiatre Allemand nommé Theodor Escherich en 1885. Il a observé la croissance de bâtonnets légèrement incurvés lorsque les fèces d'enfants étaient mis sur un milieu de croissance artificiel et nomma le microorganisme *Bacterium coli commune*. Quatre ans plus tard, Laurelle a associé cette bactérie avec des cas de diarrhée et de vomissements. En 1897 Le Sage a pu différencier des souches d'*E. coli* pathogènes des non-pathogènes en pouvant agglutiner des organismes provenant de cas de maladies avec le sérum des patients atteints, tandis qu'il n'y avait aucune agglutination des organismes provenant d'enfants sains (88).

On peut classer les membres de l'espèce selon plusieurs caractères différents, tels que les types de maladies qu'ils causent, leur hôte, leur composition antigénique, leur polymorphisme antigénique, leur profil plasmidique, la production d'hémolysines et de colicines ainsi que leur susceptibilité aux bactériophages (88).

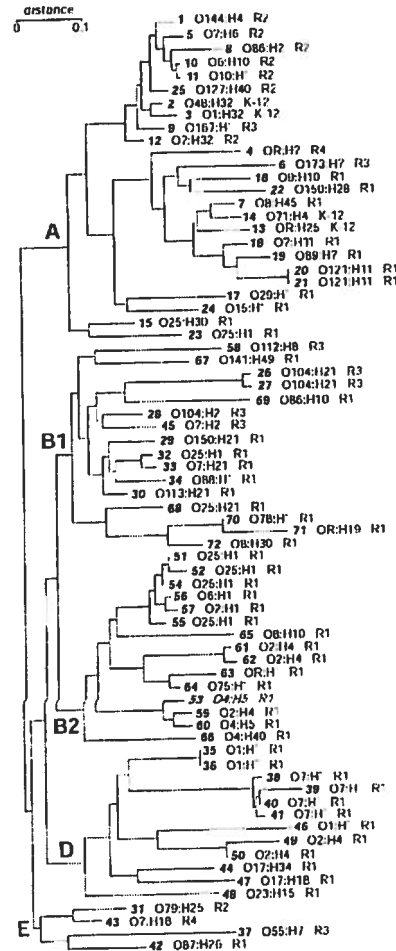
#### 1.2 Classification sérologique de *E. coli*

Les souches de *Escherichia coli* peuvent être classées selon 3 composants antigéniques majeurs présents à la surface de la cellule dont les antigènes suivants : O, lipopolysaccharides de surface; K, facteurs polysaccharidiques acides; H, antigènes flagellaires; et parfois F, antigènes fimbriaires. Kauffmann était le premier à classer *E. coli* par des méthodes sérologiques et il publia un schéma antigénique en 1947 qui

comprenait 25 antigènes O, 55 antigènes K et 19 antigènes H (88). *E. coli* est composé d'une grande diversité de sérotypes, on compte par exemple aujourd'hui plus de 170 groupes antigéniques O (45, 64).

### 1.2.1 Antigènes O

Les antigènes O sont des facteurs somatiques composés de complexes de phospholipides-polysaccharides. On différencie ces antigènes selon la nature de leurs groupes terminaux et leur ordre dans la chaîne polysaccharidique. Ces antigènes ne sont pas inactivés par la chaleur à 121°C. La caractérisation de l'antigène O se fait par l'agglutination de la bactérie en utilisant de l'antisérum de lapin produit contre des suspensions de cet antigène, chauffé à 100°C ou à 121°C. Des réactions croisées ont été observées entre certains groupes O de *E. coli* ainsi qu'entre certains antigènes O de *E. coli* et certaines espèces de *Shigella* ou de *Salmonella* (88). Les lipopolysaccharides (LPS) de *E. coli* sont composés de 3 parties : une composante hydrophobe de lipide A qui forme le feuillet externe de la membrane externe, un hétéro-oligosaccharide phosphorylé non-répétitif connu sous le nom de « core OS » et un polysaccharide (O-PS) qui s'étend de la surface cellulaire et forme l'antigène O détecté par sérotypage (140). Parmi les différents LPS de *E. coli*, le lipide A est très conservé tandis que plus de 170 antigènes O sont connus (64). De plus, les composants principaux de la partie interne du « core OS » sont conservés parmi les membres des *Enterobacteriaceae* tandis que la région externe du « core OS » est plus variable. La variabilité entre la région externe des différents « core OS » a permis de classer les « core OS » de *E. coli* en 5 types : R1, R2, R3 et K-12 (2) (Fig. 1.1).



**Figure 1.1.** Arbre phylogénétique des isolats ECOR. Le numéro de l'isolat ECOR est en gras-italique. Pour chaque isolat le sérotype O:H et le « core OS » est indiqué. OR, R-LPS; ?, antigène non-déterminé. Adapté de Amor *et al.* (2)

### 1.2.2 Antigènes K

Les antigènes K sont des facteurs polysaccharidiques acides où le terme antigène K vient du mot « Kapsel » qui veut dire antigène capsulaire ou d'enveloppe. Lors des premières études sérologiques de *E. coli*, ces antigènes interféraient avec l'agglutination des bactéries avec l'antisérum contre leur antigène O. Ce problème a été résolu pour certaines souches par le chauffage des suspensions bactériennes à 100°C ou à 121°C (88). Auparavant, les antigènes K étaient groupés en trois classes : classe L, qui perdent leur antigénicité et leur capacité de se lier aux anticorps après un chauffage à 100°C pendant 1

heure; classe A, qui perdent leur antigénicité mais maintiennent leur capacité de se lier aux anticorps après un chauffage à 121°C pendant 2 heures; classe B, qui n'ont pas d'effet sur l'agglutination des cultures non-chauffées dans l'antisérum O (88). Cette nomenclature n'est plus utilisée car d'autres structures, tels que des flagelles et des fimbriae, interfèrent avec l'agglutination. Aujourd'hui, la plupart des antigènes K sont des polysaccharides acides composés d'unités répétées d'oligosaccharides (88).

### **1.2.3 Antigènes H**

Les antigènes flagellaires H sont des facteurs sérologiques retrouvés sur la flagelline, qui est la protéine majeure qui constitue les flagelles. Cinquante-trois de ces antigènes ont été décrits chez *E. coli* (88). La majorité des antigènes H démontrent peu ou pas de réaction croisée (45). On retrouve une association de plusieurs antigènes H avec des antigènes O et ces deux derniers sont souvent des marqueurs de pathogénicité chez plusieurs souches de *E. coli* causant la diarrhée et des maladies extra-intestinales (88).

### **1.2.4 Antigènes F**

Les fimbriae ou pili sont des structures filamenteuses non-flagellaires, retrouvés à la surface de plusieurs bactéries Gram-négatives, et sont responsables de l'adhérence de celles-ci à différents tissus ou cellules de l'hôte. L'ajout des caractéristiques sérologiques des fimbriae, nommé F, comme quatrième groupe d'antigènes de surface (O: K: H: F) a été proposé par Ørskov en 1983 (127). Puisqu'une souche de *E. coli* peut exprimer plusieurs types de fimbriae, l'agglutination bactérienne n'est pas appropriée pour déterminer ces antigènes. Parmi les désignations de ces antigènes on a F1 pour les fimbriae de type 1, F2 pour les « colonisation factor antigen I » (CFA/I) et F6 à F16 pour les fimbriae P (88, 126). Des extraits bactériens de souches de *E. coli* uropathogènes ont révélé six antigènes fimbriaires, nommés F7 à F12 (127). Dix-sept antigènes F étaient décrits en 1990 (126), mais de nouveaux sont constamment découverts.

## **1.3 La diversité de *Escherichia coli***

*Escherichia coli* colonise un nouveau né dans les premières heures après sa naissance et devient la bactérie anaérobie facultative prédominante de la flore normale du

colon (108). *E. coli* est une composante de la flore intestinale des animaux et il est bénéfique à l'hôte en lui fournissant des métabolites et en compétitionnant avec des microorganismes pathogènes pour des nutriments et des sites d'attachement à l'intestin. Une grande variété de types de *E. coli* peuvent être présents dans les fèces d'adultes et avec l'ingestion de nouveaux types, ceux-ci peuvent coloniser et déplacer les anciens (14). Plusieurs fonctions physiologiques ont été associées à *E. coli* dans l'intestin, où il agit normalement comme saprophyte. Par contre, lorsque l'hôte est immunosupprimé ou que ses barrières anatomiques sont détruites, ces bactéries peuvent causer des infections invasives opportunistes. D'autres souches de *E. coli* possèdent en plus des facteurs de virulence leur permettant d'échapper ou de combattre les mécanismes de défense de l'hôte (108). Ce groupe, couramment appelé *E. coli* pathogènes, est responsable d'une variété de maladies chez les humains et chez d'autres animaux. Chez les *E. coli* pathogènes, certains sont responsables de maladies intestinales tandis que d'autres causent des maladies extra-intestinales et sont nommés ExPEC (« extra-intestinal pathogenic *E. coli* »).

### 1.3.1 Infections intestinales

Le site le plus commun d'infection par *Escherichia coli* chez l'humain est dans la voie gastro-intestinale par l'ingestion de pathogènes présents dans la nourriture ou l'eau (156). Les souches associées aux infections intestinales sont classées dans différentes catégories selon leurs facteurs de virulence ainsi que les lésions pathologiques et les signes cliniques qu'ils causent. Chaque catégorie a ses propres mécanismes pathogéniques, différentes épidémiologies et généralement des sérogroupes O caractéristiques.

Les *E. coli* entéropathogènes (EPEC) sont souvent associés avec la gastro-entérite infantile dans les pays développés. La détermination des sérogroupes associés avec des épidémies de gastro-entérite infantile ont permis de comprendre l'épidémiologie de l'infection par EPEC. Souvent, une épidémie hospitalière était due à l'admission à l'hôpital d'un cas de la même maladie (54). Les EPEC adhèrent à l'épithélium intestinal et produisent des lésions histopathologiques caractéristiques chez les modèles animaux et chez les humains (108).

*E. coli* entérotoxigène (ETEC) est une cause majeure de diarrhée chez les enfants dans les pays en voie de développement, et chez les personnes qui y voyagent. Les ETEC sont aussi une cause de diarrhée chez les porcelets, les agneaux et les veaux nouveau-nés. La pathogenèse des ETEC est due à la colonisation du petit intestin et à la production d'entérotoxines (108).

*E. coli* enterohémorragique (EHEC) est associé avec la diarrhée, le syndrome hémolytique urémique (HUS) ainsi que la colite hémorragique. *E. coli* O157:H7, qui est membre des EHEC, est responsable de plusieurs épidémies d'infections alimentaires en Amérique du Nord, en Europe et à d'autres endroits dans le monde. Une petite dose de EHEC peut être suffisante pour causer une infection car lors de la plus grande épidémie à ce jour aux Etats-Unis en 1992-1993, moins de 100 de ces organismes ont été retrouvés par « hamburger » rappelé, avant la cuisson (14).

*E. coli* entéroinvasif (EIEC) est responsable de la dysenterie. Le site principal d'infection est dans le colon et la diarrhée causée contient du mucus et du sang. Les EIEC ressemblent à *Shigella* dans leurs réactions biochimiques, leur mécanismes de pathogenèse et la maladie clinique produite (108). Les maladies causées par EIEC sont rares mais il est possible qu'elles soient sous-estimées à cause de la ressemblance entre les symptômes causés par ceux-ci et ceux causés par *Shigella* (156). Les souches d'EIEC ont la capacité de pénétrer dans les cellules épithéliales et ceci est grâce à un plasmide de 120 à 140 MDa qui code pour les gènes nécessaires à cette invasion (108).

### **1.3.2 Infections extra-intestinales**

Les colibacilloses extra-intestinales sont une cause importante de maladies chez les humains et les animaux. Chez les humains, les souches extra-intestinales de *E. coli* peuvent être classées en différents pathotypes selon la maladie qu'ils causent. *E. coli* est responsable de plus de 90% des infections du tractus urinaire (UTI), et les symptômes cliniques varient d'une bactériurémie asymptomatique à une cystite ou une pyélonéphrite (108). En plus de l'inconfort et de la perte de productivité causés lors d'une infection par les *E. coli* uropathogènes (UPEC), certains individus peuvent développer une cicatrisation ou même une insuffisance rénale.



Les infections du tractus urinaire sont plus communes chez les femmes et ce sont des *E. coli* fécaux qui en sont responsables (14). En étudiant des populations de souches uropathogènes et de souches commensales rectales chez un même groupe de femmes, Zhang *et al.* ont démontré que 69% des souches pathogènes appartenaient au groupe phylogénétique B2 de *E. coli*, tel que défini par PCR, et qu'il s'agissait aussi du groupe dominant dans les isolats rectaux (173). Ceci supporte l'idée que l'intestin, contenant des souches commensales de *E. coli*, est un réservoir potentiel pour les souches responsables des UTI. Les UPEC appartiennent à un nombre limité de sérogroupes et leur prévalence est semblable à celle dans les fèces d'individus en santé (Tableau 1.1).

La méningite néonatale causée par *E. coli* (NMEC) est commune chez les nouveaux-nés. Environ deux tiers des souches responsables de cette maladie appartiennent aux sérogroupes O1, O7, O16 et O18. *E. coli* est aussi une cause commune de méningite chez les adultes (156). De plus, des infections causées par *E. coli* telles que l'infection d'une lésion ou d'un tissu, ainsi que l'infection du tractus urinaire, peuvent mener à une septicémie. Généralement, les bactéries qui entrent dans la circulation sont éliminées assez rapidement, mais celles qui meurent libèrent une endotoxine qui mène au relâchement du « tumour necrosis factor  $\alpha$  » (TNF- $\alpha$ ) et d'interleukine-1 (IL-1). Ce sont ces facteurs qui sont responsables des symptômes physiologiques de la septicémie et du choc septique (156).

**Tableau 1.1.** Sérogroupes O de souches de *Escherichia coli* associées avec les fèces normales et diverses infections chez les humains. Adapté de Sussman *et al.* (156).

| Fèces Normaux | EPEC Épidémies | EPEC Sporadique | ETEC |      | EIEC | NMEC | UPEC | Septicémie |
|---------------|----------------|-----------------|------|------|------|------|------|------------|
| O1            | O18            | O1              | O1   | O88  | O28  | O1   | O1   | O1         |
| O2            | O20            | O2              | O6   | O89  | O29  | O6   | O2   | O2         |
| O4            | O26            | O4              | O7   | O99  | O112 | O7   | O4   | O4         |
| O5            | O44            | O6              | O8   | O101 | O115 | O16  | O6   | O6         |
| O6            | O55            | O8              | O9   | O109 | O121 | O18  | O7   | O7         |
| O7            | O86            | O15             | O15  | O114 | O124 | O83  | O8   | O8         |
| O8            | O111           | O21             | O20  | O115 | O135 |      | O9   | O9         |
| O18           | O112           | O51             | O25  | O126 | O136 |      | O11  | O11        |
| O20           | O114           | O75             | O27  | O128 | O143 |      | O22  | O18        |
| O25           | O119           | O85             | O60  | O142 | O144 |      | O25  | O22        |
| O45           | O124           |                 | O78  | O148 | O147 |      | O62  | O25        |
| O81           | O126           |                 | O80  | O153 | O152 |      | O75  | O75        |
|               | O127           |                 | O85  | O159 | O164 |      |      |            |
|               | O128           |                 |      |      | O167 |      |      |            |
|               | O142           |                 |      |      | O173 |      |      |            |
|               | O158           |                 |      |      |      |      |      |            |
|               | O159           |                 |      |      |      |      |      |            |

#### 1.4 Génomes des souches de *Escherichia coli*

La souche MG1655, qui est un *E. coli* K-12, fut la première à être séquencée et 1997 (17). Cette souche non-pathogène a été choisie car elle a été largement utilisée en laboratoire en ayant subi peu de manipulations génétiques (Blattner 1997). À ce jour, au moins 5 autres souches de *E. coli* sont séquencées et d'autres sont présentement en voie de séquençage. La taille du génome des souches de *E. coli* peut varier jusqu'à 1 Mb et les souches pathogènes ont les génomes les plus grands (12). Par exemple, *E. coli* O157:H7 possède un génome de 5.7 Mb tandis que celui de *E. coli* K-12 est de 4.6 Mb. Le transfert latéral de gènes est important chez *E. coli* O157:H7, où 1387 nouveaux gènes faisant partie de blocs d'ADN de différentes longueurs ont été retrouvés (133). Ces derniers incluent des facteurs de virulence potentiels, des capacités métaboliques alternatives, des

prophages et d'autres gènes ayant des fonctions inconnues. La présence de gènes acquis par différents pathotypes de *E. coli* contribue à leur capacité de coloniser et d'endommager certains tissus ainsi que de proliférer dans l'hôte.

#### **1.4.1 L'acquisition de gènes de virulence**

Ce qui différencie les souches commensales des souches pathogènes de *E. coli* est l'acquisition par ces dernières d'une variété de gènes de virulence leur permettant d'entrer, de coloniser et de causer différents changements pathologiques dans l'hôte. Ces gènes ont pu être acquis par des plasmides, par des phages, ou par l'intégration dans leur génome de grands blocs d'ADN nommés îlots de pathogénicité (PAIs) (35). Les PAIs sont de grandes régions d'ADN qui sont souvent instables et qui possèdent des contenus en G+C et un usage de codons qui diffèrent de l'espèce dans laquelle ils se retrouvent. Ces gènes de virulence peuvent avoir été acquis par transmission latérale d'une espèce distincte. Il est estimé qu'environ 17.6% des cadres de lecture ouverts (ORF) du génome de la souche *E. coli* K-12 MG1655, qui a un contenu moyen de G+C de 50.8%, ont été acquis par transfert horizontal (17, 85). Le transfert horizontal de gènes semble avoir été un facteur important dans l'évolution des génomes bactériens tels que *E. coli* ou *Salmonella enterica* (84, 85). Ces gènes acquis sont souvent associés soit à des « loci » de gènes d'ARN de transfert (ARNt) qui impliquent des bactériophages comme étant responsables du transfert, des éléments IS (« insertional sequence ») ou des régions plasmidiques (35).

#### **1.4.2 Clonalité et groupes phylogénétiques de *Escherichia coli***

Le mot clone a été utilisé initialement par Herbert John Webber pour désigner une population dont tous les membres proviennent d'un seul ancêtre par multiplication asexuelle. De nos jours, le terme clone est utilisé pour désigner des bactéries isolées de différentes sources ou provenant de différents lieux, mais qui ont tellement de traits phénotypiques et génétiques identiques que la seule explication serait une origine commune (125). Les populations de *E. coli* ont une structure clonale (62, 169) et plusieurs infections intestinales ou extra-intestinales causées par *E. coli* ont été associées à des clones spécifiques ou des groupes de clones reliés (4, 96, 107, 169). Des études

phylogénétiques des sérogroupes prévalents des souches APEC, O1, O2 et O78, démontrent que la majorité des isolats pathogènes appartiennent à un nombre limité de clones même s'ils proviennent d'endroits différents dans le monde (168). Cette relation entre clones provenant de divers endroits à travers le monde a aussi été observée entre souches septicémiques de *E. coli* O78 isolées de poulets, de bovins, d'ovins, de porcelets et d'humains (25, 168).

Des études phylogénétiques, basées sur du MLEE (« multilocus enzyme electrophoresis »), ont démontré que *E. coli* peut être divisé en quatre grands groupes phylogénétiques désignés A, B1, B2 et D (62). Les souches appartenant aux groupes phylogénétiques B2 et D possèdent souvent des facteurs de virulence qui sont absents des souches appartenant aux groupes A et B1 (71, 134). En conséquence, la majorité des souches responsables d'infections du tractus urinaire et d'autres infections extra-intestinales appartiennent surtout au groupe B2 et un peu moins au groupe D (53, 71, 134). Plusieurs études ont fait cette association, dont Johnson *et al.* (70) qui ont démontré que 65% des souches isolées de patients avec une bactériémie étaient du groupe B2, et Zhang *et al.* (173) qui associent 69% d'isolats d'UTI à ce groupe. Le « *E. coli* reference collection » (ECOR) est un groupement de 72 souches de *E. coli* provenant de différentes régions, et de différents hôtes et contextes cliniques, qui représente la diversité génétique de cette espèce (120) (Fig. 1.1).

### **1.5 *Escherichia coli* pathogène aviaire**

La colibacillose est une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les poulets et les dindes et est responsable de pertes économiques significatives pour l'industrie avicole. Les souches de *E. coli* capables de causer des infections chez la volaille sont communément appelés APEC (« avian pathogenic *E. coli* »). Elles sont le plus souvent associées avec des infections extra-intestinales, principalement des infections des voies respiratoires ou des infections systémiques. On retrouve ces souches dans l'environnement direct des poulets et ils peuvent causer des maladies telles que l'aérosacculite, la péricardite, la péritonite, la salpingite, le syndrome de la tête enflée, la cellulite et l'infection du jaune d'oeuf (56).

### **1.5.1 Infection du système respiratoire aviaire**

L'infection du système respiratoire chez le poulet causée par *E. coli* est une infection secondaire qui survient surtout à l'âge de 2 à 12 semaines où la majorité des pertes surviennent entre 4 à 9 semaines. Il s'agit d'une des maladies les plus communes affectant l'industrie avicole et les pertes qu'elle cause peuvent totaliser jusqu'à 20%. La diminution de la croissance, l'augmentation de la mortalité et la condamnation des carcasses sont responsables de la perte économique due à cette infection (56).

Les infections du système respiratoire aviaire sont souvent initiées ou accentuées par des facteurs biologiques prédisposants tels le virus de la maladie du Newcastle (NDV), le virus de la bronchite infectieuse (IBV) et *Mycoplasma gallisepticum* (56). De plus, la susceptibilité d'infection des poulets par *E. coli* est augmentée par des facteurs physiques tels que des mauvaises conditions de confinement, des déficiences nutritionnelles ou la déciliation des cellules épithéliales du système respiratoire supérieur après l'exposition à l'ammoniaque et à la poussière. Les fèces et la poussière dans l'élevage sont des sources importantes de souches de *E. coli* pathogènes. L'infection de la voie respiratoire du poulet est causée par l'inhalation de poussières contaminées par des fèces et il y a une relation positive entre les sérogroupes retrouvés dans la poussière et ceux isolés de cas de septicémie (56).

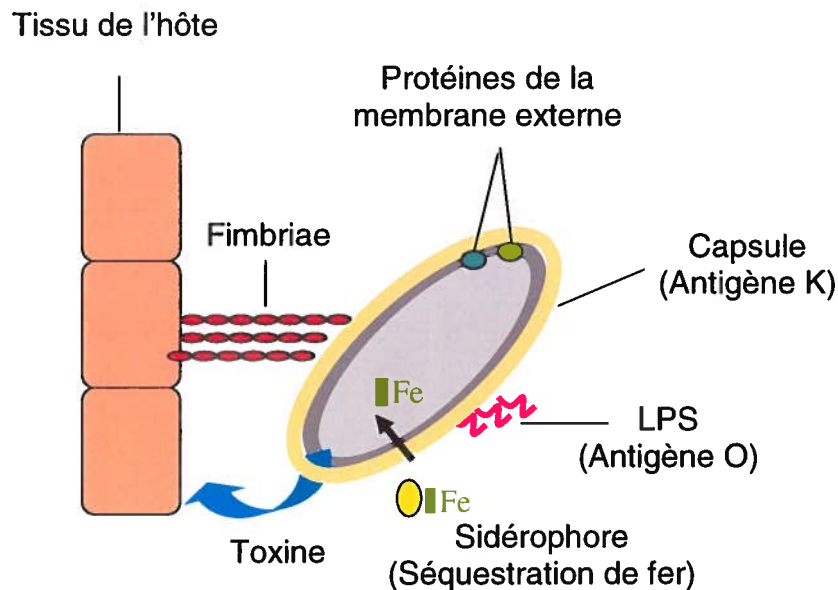
L'infection la plus commune chez la volaille causée par *E. coli* est une maladie respiratoire, nommée aérosacculite, chez les poulets de 3 à 12 semaines qui est généralement suivie d'une infection généralisée qui peut inclure une périhépatite, une péricardite ou une septicémie. Les régions d'échange d'air dans le poumon et les sacs aériens, qui sont vulnérables à la colonisation et à l'invasion bactérienne, sont des sites d'entrée importants de *E. coli* dans le sang pendant les stades initiaux de l'infection (55).

### **1.6 Facteurs de virulence chez *Escherichia coli* pathogène aviaire**

Les sérogroupes les plus communs des APEC sont O1, O2 et O78. Par contre, plusieurs souches pathogènes n'appartiennent à aucun séro groupe établi et ils sont désignées non-typables. On retrouve rarement ces sérogroupes pathogènes chez les poulets en santé (56). Les sérogroupes O78 sont aussi responsables de la septicémie chez

le veau, le porcelet et l'agneau et de plus ont été isolés d'infections extra-intestinales chez les humains (25, 104).

Il y a très peu de connaissances sur les facteurs qui facilitent la colonisation des voies respiratoires, l'entrée dans le sang ou les étapes subséquentes qui sont impliquées dans la virulence des souches APEC. La colisepticémie est une maladie multifactorielle dont seulement un nombre limité de facteurs de virulence putatifs ont été identifiés. Parmi ceux-ci on retrouve des organelles à la surface cellulaire, comme des fimbriae qui servent d'adhésines, des flagelles, ou des facteurs qui permettent à la bactérie de survivre et de se propager dans l'hôte (Fig. 1.2).



**Figure 1.2.** Facteurs de virulence chez les *E. coli* extra-intestinaux. Adapté de Eisenstein et Jones (41).

### 1.6.1 Antigène K

Les antigènes K les plus communs chez les souches de APEC sont K1 et K80. L'antigène K1 a aussi été associé à des infections extra-intestinales chez les humains et est souvent associé aux sérogroupes O1 et O2 (18, 56). La capsule polysaccharidique K1 a été identifiée comme étant un facteur de virulence chez des souches APEC de sérogroupes O2 (21). Cet antigène semble être impliqué dans la résistance d'APEC aux

défenses immunitaires de l'hôte. La capsule a un effet anti-phagocytaire (165) et elle pourrait être impliquée dans la résistance aux effets bactéricides du sérum (135, 152). Les capsules polysaccharidiques de *E. coli* peuvent interagir avec les activateurs C3b dans les voies classiques et alternatives du complément, permettant à ces bactéries de résister aux effets bactéricides de ce dernier (102). Une corrélation a été démontrée entre la présence de la capsule K1 chez des souches APEC et leur résistance aux effets bactéricides du sérum (135). En plus, la capsule K1 de la souche APEC MT78 (O2:K1) augmente la résistance de celle-ci au sérum ainsi que sa capacité de coloniser les organes internes des poulets infectés. Elle sert aussi en partie à éviter les étapes initiales de la phagocytose (102, 103).

### 1.6.2 Systèmes de séquestration de fer

Les liquides physiologiques des animaux contiennent une concentration d'environ  $10^{-18}$  mol L<sup>-1</sup> de fer libre mais les bactéries en ont besoin d'environ  $10^{-6}$  mol L<sup>-1</sup>. Pour survivre dans cet environnement et pour faire concurrence aux sidérophores de l'hôte, tel que la transferrine, plusieurs bactéries pathogènes ont développé des systèmes d'acquisition de fer de haute affinité (31). La présence du système aérobactine, qui confère aux souches de *E. coli* la capacité de croître dans un milieu pauvre en fer, a été associée à la létalité des souches chez les poulets de 1 jour (30). L'aérobactine est associée aux souches ExPEC et contribue à leur virulence dans les modèles d'infection du tractus urinaire chez la souris et de la septicémie chez l'ovin (29, 160). Ce système se retrouve chez la plupart des souches APEC, où 98% des souches isolées de poulets septicémiques et 73% des souches isolées de dindes septicémiques le possèdent (38), tandis qu'on le retrouve moins fréquemment chez les souches non-pathogènes (44, 87). L'opéron de l'aérobactine se retrouve souvent sur les plasmides ColV (163, 167) et puisque ces derniers contiennent souvent plusieurs gènes de virulence, ils ont été associés avec la virulence de certaines souches APEC (147, 166).

Le locus *iroBCDEN* de *E. coli*, qui est un système d'acquisition de fer homologue à celui de *S. enterica* (8), est exprimé par la souche APEC  $\chi$ 7122 dans des tissus de poulets infectés (36). Le système Iro code pour des sidérophores catécholates, nommés salmochélines, chez *Salmonella enterica* et *Escherichia coli* (58). Les salmochélines sont

des molécules de dihydroxybenzoylsérine (DBS) liées par des molécules de glucose (58). Chez une souche ExPEC, l'expression de IroN, qui est le récepteur membranaire primaire pour le transport de salmochéline ferrique, est réprimée par la présence de fer (58, 143).

L'importance des systèmes Iro et aéro bactéine a été démontrée par la diminution de la persistance et la diminution de la production de lésions dans des tissus de poulets infectés, par la délétion de ces deux systèmes chez la souche  $\chi 7122$  (36). Ces systèmes semblent fonctionner conjointement afin d'augmenter la capacité d'acquisition de fer par la bactérie dans les tissus extra-intestinaux.

### 1.6.3 Résistance au sérum

Plusieurs souches APEC sont résistantes aux effets bactéricides du complément dans le sérum (13). Différentes structures à la surface de la cellule pourraient être responsables de cette résistance, tels que les lipopolysaccharides (LPS), des protéines de la membrane externe, la capsule et la production de ColV (56, 111, 170). Plusieurs études ont trouvé une corrélation entre la résistance des souches au sérum et leur virulence dans l'infection chez le poulet ou la dinde (38, 43, 66, 114, 171).

Le lipopolysaccharide O78 et la capsule K1 de certaines souches APEC augmentent la capacité de ces bactéries à résister au sérum (102). De plus, Mellata *et al.* (102) ont démontré que le remplacement de l'antigène O78 chez la souche  $\chi 7122$  par les antigènes O1 ou O26 rendaient les dérivés de cette souche sensibles au sérum. La résistance au sérum semble être médiée par les chaînes latérales des polysaccharides de l'antigène O (152).

Chez certaines souches de *E. coli*, les protéines de la membrane externe encodées par les gènes *iss* et *traT*, augmentent la résistance de ces souches à l'effet bactéricide du sérum (15, 105, 155, 157). Le gène *iss* (« increased serum survival ») se retrouve plus fréquemment chez les souches APEC que les souches de *E. coli* provenant des fèces de poulets sains (113).

### 1.6.4 Toxines

Même si des toxines ont été identifiées chez certaines souches APEC, peu d'études ont démontré l'implication de ces toxines produites par APEC dans le procédé



pathogénique (31). Des souches entérotoxigènes de *E. coli* (ETEC) de sérotypes O8 et O149, qui produisent la « heat labile toxin » (LT) et parfois la « heat stable toxin » (ST), ont été impliquées dans des cas d'entérite accompagnés de septicémie chez le poulet (56). Par contre, peu d'épidémies de diarrhée chez le poulet sont causées par ETEC (74). La maladie causée chez le poulet par les VTEC, les EIEC, les EPEC et les EHEC sont beaucoup moins fréquentes que celles causées par les sérogroupes O1, O2 et O78 des APEC (83).

De 625 souches APEC testées, seulement 7% étaient productrices de toxines (16). La « chicken lethal exotoxin » (CLT) est produite par des souches APEC de sérotype O2, O45 et O109 mais en général on la retrouve rarement chez d'autres sérogroupes d'APEC (162). Ensuite, des souches APEC de sérotype O86:K61 peuvent produire la « cytolethal distending toxin » (CLDT) (49).

Une cytotoxine, produisant des effets morphologiques similaires et ayant des propriétés semblables à la cytotoxine VacA de *H. pylori*, a été identifiée chez 30 souches APEC (144). Elle a été nommée autotransporteur Vat, pour « vacuolating autotransporter toxin », et elle produit des effets cytotoxiques en induisant la formation de vacuoles intracellulaires (131). Vat est requis pour la virulence de la souche APEC Ec222 et l'inactivation du gène *vat* chez cette souche la rendait non-pathogène dans le modèle d'infection respiratoire-septicémique et le modèle de cellulite de la maladie (131).

Les gènes *stx* (*stx1* et *stx2*) de *E. coli*, similaires aux gènes *stx* de *Shigella dysenteriae*, ont été retrouvés chez plusieurs souches APEC, dont 6 des 8 souches de sérotype O2 et 13 des 13 souches de sérotype O78 (132). Quoique ces séquences semblent être assez répandues chez les APEC, la cytotoxicité chez les cellules Vero n'est pas commune et a seulement été identifiée chez les souches causant le « swollen head syndrome » (SHS) (132).

### 1.6.5 Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont de longs filaments protéiques à la surface de la cellule qui ont un diamètre de 7 nm et une longueur d'environ 0.1 à 2.0 µm (79). L'adhésine, FimH, leur confère la capacité de se lier au D-mannose, ce qui permet aux bactéries portant ces fimbriae de se lier à une variété de cellules eukaryotes, dont des cellules de la

trachée, du poumon, de la vessie et du rein (83). Les fimbriae de type 1 sont exprimés à la surface des bactéries qui colonisent les voies respiratoires, dont la trachée, les sacs aériens et les poumons des poulets infectés expérimentalement (34, 135). Par contre, ils ne sont pas exprimés dans le sang ou dans d'autres organes internes chez le poulet (135). Des expériences faites sur des poulets SPF (« specific-pathogen free ») avec des souches mutantes pour les fimbriae de type 1 démontrent que ces fimbriae sont impliqués dans la colonisation des poumons mais ils ne sont pas requis pour la colonisation d'autres organes (95). Chez les poulets axéniques, des infections faites avec ces mêmes mutants ont démontré que les fimbriae de type 1 ne sont pas nécessaires pour la colonisation des voies respiratoires ou d'autres organes (95). Ces résultats suggèrent que les fimbriae de type 1 ont un rôle limité dans la pathogénèse des souches APEC. Les fimbriae de type 1 peuvent aussi jouer un rôle dans l'interaction de *E. coli* avec le système immunitaire. Il a été démontré que ces fimbriae peuvent activer des mastocytes via l'adhésine FimH et que cette activation aurait comme conséquence la phagocytose et le recrutement de neutrophiles au site de l'infection (92-94).

#### **1.6.6 Fimbriae P**

On retrouve surtout les fimbriae P chez les souches uropathogènes humaines de *E. coli*. Seulement une minorité des souches APEC les exprime (83). L'adhésine des fimbriae P, PapG, dont on retrouve trois variantes, permet l'adhésion à différents isorécepteurs de la globosérie des glycolipides qui contiennent le disaccharide gal-gal (154). Ces fimbriae permettent aux bactéries d'adhérer aux cellules uroépithéliales et sont des facteurs importants dans le développement de la pyélonéphrite (75). Il est suggéré qu'ils sont importants dans les phases tardives de l'infection chez le poulet car ils sont exprimés dans les sacs aériens et d'autres organes internes mais ne le sont pas dans la trachée (136). De plus, on ne retrouve pas les récepteurs des fimbriae P sur la trachée des poulets (39).

#### **1.6.7 Tsh**

Tsh est une hémagglutinine qui appartient à la famille des sérine protéases d'autotransporteurs (60). Les autotransporteurs peuvent avoir diverses fonctions telles

que celles d'adhésines, de protéases, de cytotoxines ou d'invasion cellulaire (61, 89). Même si *tsh* contient un motif sérine protéase, aucune protéolyse d'IgA humain, d'IgA de poulet ou de caséine n'a pu être détectée (151). Par contre, une protéine identique à Tsh identifiée chez une souche de *E. coli* causant des infections intra-abdominales chez les humains, nommée « hemoglobin-binding protease » (Hbp), est une protéase d'hémoglobine (129). En plus, Tsh démontre une activité de mucinase (40). Tsh est dite température sensible car son activité d'héماغglutination est exprimée entre 26°C et 30°C mais réprimée à 42°C (138). Par contre, la protéine est quand même exprimée à des températures plus élevées, dont 37°C et 42°C (151). Le gène *tsh* est souvent retrouvé sur des plasmides de type ColV (37, 98). La présence du gène *tsh* est associée avec des souches pathogènes, où 46% des souches APEC testées le contenaient tandis qu'on ne le retrouvait pas chez les souches provenant d'animaux sains (98). De plus, *tsh* est associé avec des souches APEC du groupe de haute létalité (37). Lors d'infections expérimentales, *tsh* contribue au développement de lésions dans les sacs aériens mais il n'est pas responsable de la pathogénicité de la souche sauvage dans les voies respiratoires profondes et dans les tissus extra-respiratoires (37).

#### 1.6.8 Curli

Les curli sont des structures aggrégatives minces et ondulées, d'un diamètre d'environ 2 nm, retrouvées à la surface de la plupart des souches de *E. coli* (83). Dho-Moulin *et al.* ont détecté le gène *csgA*, qui code pour la sous-unité majeure des curli, dans 298 des 300 souches APEC testées (31). Les curli sont exprimés de façon optimale *in vitro* à 26°C en phase stationnaire et dans un milieu de croissance de basse osmolarité (121). Ces structures permettent l'adhésion à plusieurs structures telles que la laminine, le plasminogène, la fibronectine, et des molécules d'histocompatibilité majeure (MHC) de classe I (121-123, 148). Leur présence est associée à la formation de biofilms et ils sont responsables de l'internalisation d'une souche de *E. coli* O78 par des cellules eukaryotes (51, 142).

En comparant une souche mutante dans la production de curli avec une souche sauvage, aucune réduction significative n'a été observée entre les deux pour leur adhérence et leur invasion à des lignées cellulaires ainsi que pour leur l'adhérence à des

tissus de la trachée de poulets (82). Par contre, lorsque ces expériences ont été répétées dans des conditions favorables pour l'expression des curli, des différences significatives ont été observées pour tous ces tissus. De plus, l'adhésion à des tissus d'intestin a été réduite de façon significative chez le mutant. Les curli sont aussi responsables de la persistance de APEC dans le caecum des poulets (81, 82).

#### **1.6.9 Fimbriae AC/1**

Les fimbriae AC/1 appartiennent à la famille des adhésines fimbriaires S. Ils permettent aux bactéries d'adhérer à l'épithélium aviaire *in vitro* et *in vivo* mais ils ont seulement été retrouvés chez certaines souches de *E. coli* du sérogroupe O78 (5, 172).

#### **1.6.10 Flagelles**

On retrouve les flagelles, les organelles filamenteuses qui confèrent aux bactéries la motilité dans les milieux liquides, sur la majorité des souches APEC (83). Ils ont une longueur d'environ 150 µm, ont un diamètre d'environ 20 nm et on en retrouve de 5 à 10 copies à la surface d'une cellule de *E. coli*. Un mécanisme de chimiotaxie permet aux bactéries de se diriger vers des stimuli chimiques tels que les nutriments ou de s'éloigner de mauvaises conditions (83). Les flagelles semblent importants pour pénétrer le mucus avant d'adhérer à l'épithélium. Ceci a été démontré lorsque l'adhésion de souches mutantes non-flagellées, à la lignée cellulaire HT2916E qui sécrète du mucus, a été réduite de 90% par rapport à la souche sauvage. Par contre, la réduction d'adhésion de ce mutant n'était pas significative sur la lignée cellulaire HT2919A qui ne sécrète pas de mucus (82).

### **1.7 Recherche de séquences pathogène-spécifiques chez APEC**

La souche APEC  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9) est capable de causer l'aérossaculite et la septicémie chez les poulets (139). Afin d'identifier des régions d'ADN uniques dans le chromosome de la souche  $\chi$ 7122, qui sont absentes de la souche *E. coli* K-12  $\chi$ 289, Brown et Curtiss (23) ont effectué une soustraction génomique entre ces deux souches. Ils estiment qu'il y a environ 8% de différence entre la taille des deux génomes, ce qui correspond à environ 300 à 400 kb. Les régions d'ADN uniques à une souche pathogène

ne sont pas nécessairement associées à la virulence mais des quatre régions uniques à  $\chi 7122$  qui ont été remplacées par des régions d'ADN de  $\chi 289$ , deux de ces mutants étaient moins virulents lorsqu'ils ont été inoculés dans le sac aérien de poulets. Ces mutations ont été effectuées dans les régions qui correspondent à 0.0 min et 45 min dans le chromosome de *E. coli* K-12. Par contre, la voie d'inoculation utilisée lors de ces expériences ne permet pas d'identifier des mutants qui seraient moins virulents dans les premières étapes de la colonisation des voies respiratoires.

La méthode de SCOTS (« selective capture of transcribed sequences ») a permis d'identifier des séquences uniques à la souche  $\chi 7122$  qui sont exprimées *in vivo* dans des tissus de poulet lors de l'infection (36). Les transcrits isolés par SCOTS correspondent à des gènes qui ont une variété de fonctions putatives déterminées par homologie de séquence, dont l'adhérence, la synthèse de lipopolysaccharides, la réponse au fer et d'autres ayant des fonctions inconnues.

## 1.8 Fimbriae

Parmi les premiers événements qui surviennent lors d'une infection bactérienne est l'interaction entre le pathogène et les cellules de l'hôte. Cette interaction est requise pour que le pathogène puisse coloniser, se multiplier et ensuite se disséminer dans l'hôte. Ce sont des adhésines à la surface du microbe qui sont responsables de la liaison à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules de l'hôte. Dans certains cas, les adhésines sont associées à la surface de la bactérie et ils sont nommées « non-fimbrial adhesins », tandis que d'autres fois elles sont assemblées en filaments, nommés fimbriae, qui s'étendent de la surface de la cellule (150).

Le mot fimbriae vient du mot latin qui désigne un fibre ou un fil. Il s'agit de filaments protéiques à la surface des bactéries qui servent d'outils d'adhésion à différentes surfaces ou tissus de l'hôte. *Escherichia coli* et *Salmonella* spp. expriment une variété de fimbriae avec des spécificités d'adhésion différentes et les isolats peuvent exprimer plusieurs types de fimbriae à la fois(90). Le terme pili est souvent employé de façon interchangeable pour nommer des fimbriae mais il a été suggéré de garder le terme pili pour les filaments qui servent au transfert d'ADN lors de la conjugaison bactérienne (130). Le diamètre de différents fimbriae varie entre 2 et 8 nm et contrairement aux

flagelles, ils sont présents en grand nombre, de 100 à 1000 fimbriae, à la surface de la cellule (90).

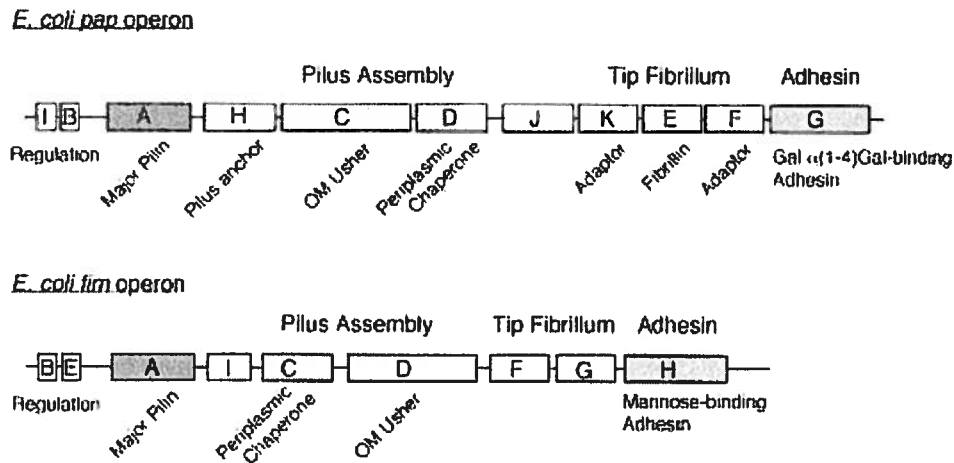
Plusieurs mécanismes d'assemblage de ces organelles à la surface de la cellule ont été décrits, mais les mieux caractérisés sont les suivants : la voie du « chaperone-usheer », la voie de la sécrétion générale, la voie de la précipitation-nucléaire extracellulaire et la voie du chaperone alterne (150).

### 1.8.1 Organisation, structure et assemblage des fimbriae

Les opérons fimbriaires peuvent se retrouver soit sur un plasmide ou sur le chromosome. La plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la régulation d'un même fimbriae sont contigus. Parfois, même en étant contigus, ils sont organisés en opérons séparés, comme dans le cas de *pap*, où *papI* est transcrit de façon divergente de l'opéron portant les gènes fimbriaires. Dans d'autres cas, comme pour *coo* (CS1) ou *cfa* (CFA/1), les gènes sont carrément séparés (90).

Les fimbriae P sont des fibres composées où le bout fibrillaire contient surtout des sous-unités PapE et le filament majeur est composé de sous-unités PapA (Fig. 1.4). Le filament majeur a un assemblage d'hélice « right-handed » avec un diamètre externe de 68Å, un trou axial de 15Å et 3.28 sous-unités par tour d'hélice (24, 50). L'adhésine PapG est responsable de la liaison à des unités Gal $\alpha$ (1,4)Gal, qui se retrouvent dans les globoséries des glycolipides sur les cellules uroépithéliales et sur les érythrocytes (153). La protéine adaptatrice PapF joint les sous-unités PapE et PapG et la protéine adaptatrice PapK joint ce bout contenant les sous-unités PapG, PapF et PapE au filament majeur formé par des sous-unités PapA. Cela suggère que l'incorporation de la sous-unité PapH à la base du fimbriae signale la fin de l'assemblage de cette structure (150).

Au moins 9 gènes sont nécessaires pour l'expression et l'assemblage des fimbriae de type 1 (Fig. 1.3). Le bout fibrillaire est composé de FimG, de l'adhésine FimH et possiblement de FimF. Ce bout est joint au filament majeur composé principalement de FimA (73). Les sous-unités FimA forment une hélice d'un diamètre externe de 6 à 7 nm, d'un trou axial de 20 à 25Å et avec 3.125 sous-unités par tour (22).



**Figure 1.3.** Opérons qui codent pour les fimbriae P et type 1 des souches de *E. coli* uropathogènes. Gènes des opérons *pap* et *fim* des souches de *E. coli* uropathogènes, qui codent pour les fimbriae P et les fimbriae de type 1 respectivement. Ces opérons contiennent les gènes qui codent pour les sous-unités structurales du filament majeur et du bout du fimbriae, incluant l'adhésine, ainsi que leurs chaperons et leurs « ushers » respectifs. Une organisation génique similaire peut être observée entre ces deux opérons et cet arrangement ressemble à l'organisation structurale des fimbriae. De plus, le gène qui code pour la sous-unité majeure est le premier gène traduit à partir des ARNm polycistroniques dérivés de ces opérons. Cette localisation est partiellement responsable de la production plus élevée de la sous-unité majeure. Adapté de Fernandez *et al.* (46)

### 1.8.2 Voie du « chaperone-uscher »

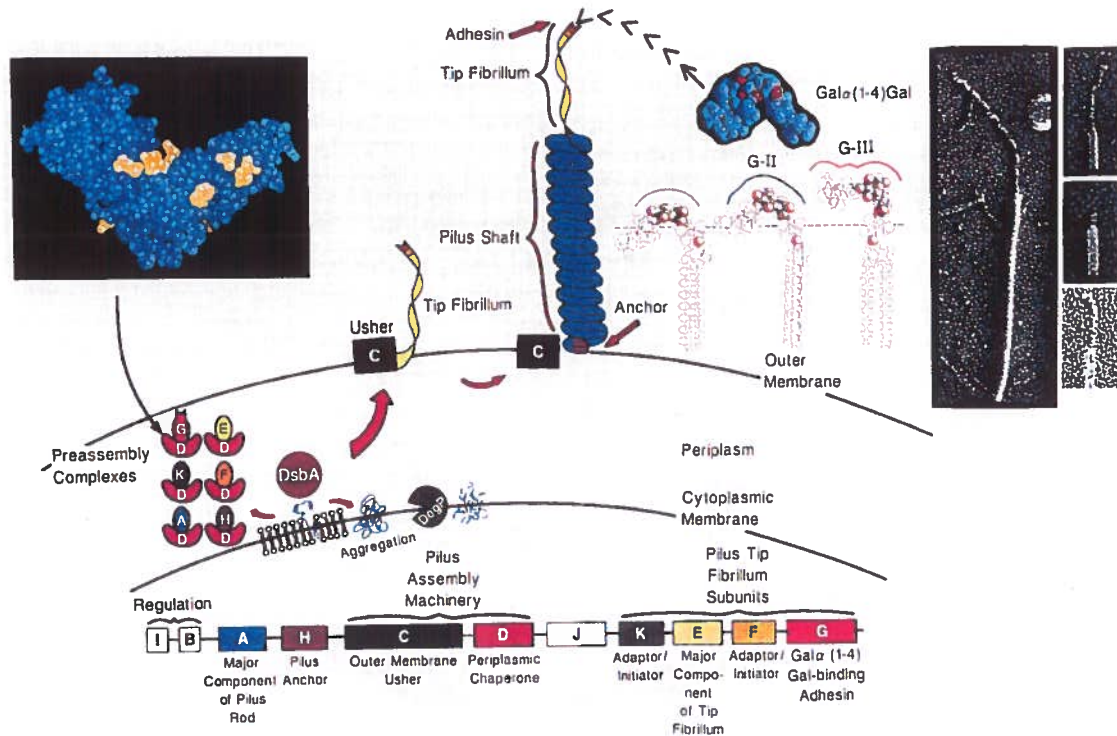
Plus de 30 structures adhésives sont assemblées via la voie du chaperone-uscher chez les bactéries Gram-négatives (146). Les fimbriae P et les fimbriae de type 1 sont assemblés par cette voie (150). La machinerie d'assemblage comporte deux classes spécialisées de protéines, un chaperon périplasmique et un « usher » ancré à la membrane externe. Les fimbriae P seront utilisés comme exemple pour expliquer le mécanisme d'assemblage par cette voie (Fig. 1.4). La structure cristalline du chaperon PapD contient deux domaines semblables aux immunoglobulines qui sont orientés un vers l'autre, donnant à PapD une forme de « boomerang » (Fig. 1.5) (63). On peut classer les chaperons dans deux sous-familles distinctes basées sur des différences en acides aminés

conservés dans le repliement et selon la longueur de la boucle qui lie les feuillets- $\beta$  F1 et G1 du domaine 1. La sous-famille FGS (F1-G1 short) a des longueurs de boucle de 20 acides aminés et moins tandis que la famille FGL (F1-G1 long) a des longueurs de boucle de 21 acides aminés et plus (150). Les chaperons FGS sont impliqués dans l'assemblage de fimbriae avec une architecture en forme de gros filament, comme PapD, tandis que les chaperons FGL sont impliqués dans l'assemblage de fimbriae très minces ou d'adhésines non-fimbriaires. PapD forme des complexes de préassemblage périplasmique avec chacune des sous-unités avant leur incorporation dans le fimbriae. Les chaperons FGS reconnaissent un motif conservé chez les autres sous-unités, qui est une série de résidus hydrophobes entre une glycine qui se retrouve à 14 résidus du côté C-terminal et une tyrosine (80). Une région conservée du côté N-terminal de certaines sous-unités assemblées par ces chaperons, composée de résidus hydrophobes et d'une cystéine, est aussi reconnue lors de l'assemblage (149).

Le système de sécrétion général (Sec) est responsable de la translocation initiale des sous-unités des fimbriae P à travers la membrane cytoplasmique. Les sous-unités sont retenues dans la membrane interne via leur côté C-terminal hydrophobe et elles forment des complexes de préassemblage en présence de PapD. Le relâchement des sous-unités de la membrane interne est nécessaire pour leur repliement dans une conformation propice à l'assemblage en fimbriae (72, 149). Les complexes chaperon/sous-unité sont ensuite dirigés à PapC, le « usher » dans la membrane externe, pour l'assemblage du fimbriae. Au moins six sous-unités PapC sont nécessaires pour former un pore dans la membrane externe, ayant un diamètre de 2 à 3 nm (158). Une structure composée de plusieurs feuillets- $\beta$  est prédite pour PapC et d'autres membres de la famille des « ushers », où de larges régions sont présentées au périplasme pour l'interaction avec les complexes chaperone/sous-unité. Puisque le diamètre de ces pores est assez petit, il a été proposé que le filament majeur du fimbriae est transloqué à travers la membrane externe dans une forme linéaire et que la structure d'hélice est formée une fois à l'extérieur (158). PapC reconnaît différemment les complexes chaperone/sous-unité selon leur position finale dans le fimbriae et ceci dépend de la cinétique de liaison avec le « usher » du même système (145). La reconnaissance entre les sous-unités est un autre facteur qui

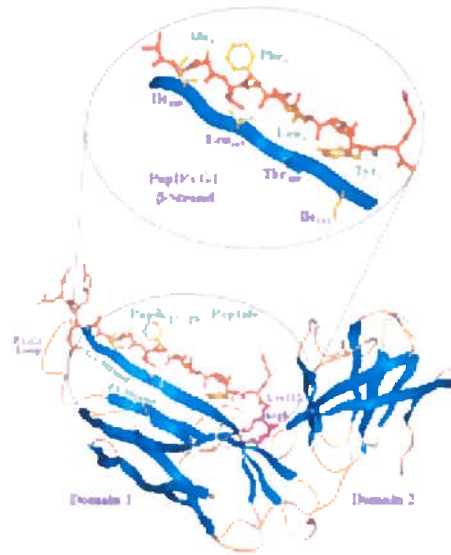


régle l'ordre d'incorporation des différentes sous-unités lors de la formation de l'organelle (68).



**Figure 1.4.** Développement, structure et fonction des fimbriae P. Le groupe de gènes *pap* ainsi que la fonction de chaque gène est indiqué. La couleur des gènes correspond à la couleur des produits de chaque gène dans le modèle d'assemblage. En absence de PapD, les sous-unités fimbriaires sont dégradées par la protéase DegP. DsbA est responsable de la formation de liens disulfures chez PapD et les autres sous-unités. Le modèle de PapD est basé sur sa structure tridimensionnelle connue. Les résidus jaunes sont exposés à la surface et sont des résidus hautement conservés dans la superfamille des chaperons. La microscopie électronique à haute résolution a permis de déterminer que les fimbriae P sont composés d'un bout fibriare joint au bout distal du filament majeur (photos à droite). De haut en bas, les trois photos de microscopie électronique à droite représentent un fimbriae P, un fimbriae de type 1 et un fimbriae S. Ces deux derniers ont aussi des architectures composées. L'architecture du fimbriae démontre une stratégie qui permet à

*E. coli* de présenter l'adhésine dans une configuration accessible qui permet la reconnaissance d'isorécepteurs contenant des résidus Gal $\alpha$ (1-4)Gal. Les adhésines G-I, G-II et G-III déterminent la reconnaissance à haute affinité de trois différents isorécepteurs Gal $\alpha$ (1-4)Gal. Adapté de Hultgren *et al.* (65).



**Figure 1.5.** Représentation de la structure cristalline des peptides PapD et PapK. La magnification permet d’observer l’interface de contact entre les peptides PapD et PapK. Les résidus conservés hydrophobes du peptide qui alternent interagissent avec les résidus sur le feuillet- $\beta$  de la bande G1 de PapD. Adapté Soto *et al.* (150).

### 1.8.3 Famille des fimbriae LP

Les gènes *lpfABCDE*, qui codent pour les fimbriae LP (« long polar »), ont initialement été identifiés chez *Salmonella typhimurium* (7). L'organisation génétique de *lpf* est semblable à celle des fimbriae de type 1 (7). Les fimbriae LP ont un diamètre d'environ 7 à 8 nm et une longueur entre 2 et 10 µm. Par homologie de séquence, les gènes *lpf* pourraient coder pour les sous-unités putatives suivantes : *lpfA*, sous-unité majeure; *lpfB*, chaperon; *lpfC*, « usher »; *lpfD*, adhésine; *lpfE*, sous-unité mineure (7). Un opéron homologue, nommé *lpfABCC'DE*, a été retrouvé chez la souche EDL933 EHEC

O157:H7 à l'îlot 141 (159). Les gènes *lpf* de *S. typhimurium* et *E. coli* EDL933 se retrouvent au même endroit sur le génome, entre les gènes *yhjX* et *yhjW*, à environ 78 min sur le chromosome de *E. coli* K-12 (7, 159). Chez *E. coli* O157:H7 le gène qui code pour le « usher » putatif est tronqué par rapport à *lpfC* de *S. typhimurium*. *lpfC* de la souche EHEC contient un codon d'arrêt et des codons d'initiation alternatifs pour *lpfC'* à 144 et 972 nt en aval de *lpfC*. Malgré ce fait, les fimbriae LP de *E. coli* O157:H7 semblent être produits puisqu'ils ont été observés à la surface cellulaire par microscopie électronique. De plus ils contribuent à l'adhérence d'une souche de *E. coli* K-12 à des cellules HeLa et des cellules MDBK (159). Contrairement à la distribution polaire observée chez *S. typhimurium*, les fimbriae LP de la souche EHEC semblent être distribués de façon péritriche autour de la cellule (159).

Les fimbriae LP de *S. typhimurium* contribuent à l'adhésion de la bactérie sur les plaques de Peyer du petit intestin murin (10). De plus, *lpf* de *S. typhimurium* est nécessaire pour l'adhésion et l'invasion des cellules Hep-2 mais ne l'est pas pour les lignées cellulaires T-84, INT407 or HeLa (9). Un homologue à *lpf* de *S. typhimurium*, nommé *lpf<sub>RI41</sub>* et retrouvé chez une souche EPEC de lapin (REPEC), contribue aux stades initiaux de la colonisation ainsi que dans la sévérité de la diarrhée (110). La combinaison des mutations *lpfC* et *invA*, deux gènes nécessaires pour l'entrée dans les plaques de Peyer, a un effet synergétique sur la pénétration intestinale et la virulence de *S. typhimurium* chez la souris (11). L'atténuation de la virulence par les mutations *lpfC* et *invA* a été observée lorsque les souris étaient infectées par la voie orale mais pas lors de l'infection par la voie intrapéritonéale. Ces données démontrent la redondance ou l'action synergétique des facteurs de virulence qui ont un effet sur la pénétration de la barrière intestinale par *S. typhimurium* (11). De plus, l'inactivation simultanée des opérons fimbriaires *lpf*, *pef* et *agf* diminue la virulence de *S. typhimurium* chez la souris beaucoup plus que lorsqu'ils sont inactivés individuellement (164).

La transcription de l'opéron *lpf* chez *S. typhimurium* est régulée par la variation de phase, qui est une oscillation entre la phase ouverte « on » et la phase fermée « off » d'expression, régulée par un mécanisme d'alternance aléatoirement héritable (116). La variation de phase a comme résultat l'expression des fimbriae sur une fraction des bactéries dans une même culture, ce qui aurait comme résultat potentiel d'échapper au

système immunitaire. Par contre, la variation de phase par *lpf* sert à éviter l'immunisation croisée entre les sérotypes de *Salmonella*, ce qui permet leur coexistence dans une population hôte (112, 115).

Un fimbriae homologue à *lpf*, nommé *lpf<sub>O113</sub>*, a été identifié par Doughty *et al.* chez une souche EHEC O113:H21 (33). *lpf<sub>O113</sub>* est localisé à environ 84 min dans le génome de *E. coli* K-12, entre les gènes *glmS* et *pstS*. Chez *E. coli* O113:H21, l'opéron *lpf* contient 4 ORFs putatifs, *lpfABCD* (33). Un mutant *lpfA* chez *E. coli* O113:H21 était moins adhérent à des cellules CHO-K1 (ovaire de hamster chinois) que la souche sauvage (33). Un groupe de gènes identiques à *lpf<sub>O113</sub>*, nommés *lpf<sub>R154</sub>*, ont été identifiés chez la souche 83/39 REPEC O15:H- (110). *E. coli* O157:H7 contient aussi un opéron homologue sur l'îlot 154 entre les gènes *glmS* et *pstS* (133).

### 1.9 Régulation des gènes de virulence

L'habilité de survivre, se multiplier et proliférer dans les fluides ou les cellules d'un hôte est une capacité qui distingue les bactéries pathogènes des espèces commensales. Elles possèdent plusieurs facteurs de virulence qui généralement ne sont pas des composantes essentielles de la structure ou de la fonction cellulaire, mais ils leur confèrent la capacité d'infecter certains tissus de l'hôte. Ces gènes de virulence sont rarement exprimés constitutivement afin d'éviter une dépense d'énergie inutile, et ils ne confèrent pas nécessairement un avantage aux bactéries quant à leur survie pendant tout le processus d'infection. Seulement certains gènes confèrent un avantage sélectif à un endroit spécifique de l'infection. Des facteurs environnementaux, qui varient selon l'étape de l'infection et le site anatomique de l'hôte, influencent l'expression de ces gènes. Ces facteurs influencent ensuite certains signaux cellulaires qui régulent l'expression des gènes, soit au niveau de la transcription ou de la traduction, permettant donc la production de ces facteurs au moment approprié. La régulation de l'expression des gènes de virulence permet donc aux bactéries pathogènes de s'adapter efficacement à leur environnement changeant afin de survivre et se multiplier (59, 91).

### 1.9.1 Facteurs environnementaux

Puisque la bactérie doit réguler l'endroit où chacun de ses facteurs de virulence sont exprimés, les facteurs environnementaux servent de signaux lui indiquant dans quel lieu anatomique elle se retrouve. Parmi les facteurs environnementaux jouant un rôle dans l'expression des gènes de virulence *in vitro*, on retrouve la concentration de fer, de sucres et d'acides aminés, la température, le pH, la source d'azote et l'osmolarité (59). Par exemple, la température est un bon indicateur de l'entrée de l'organisme dans l'hôte. À 37°C chez les mammifères, plusieurs facteurs de virulence sont exprimés.

#### 1.9.1.1 Le fer

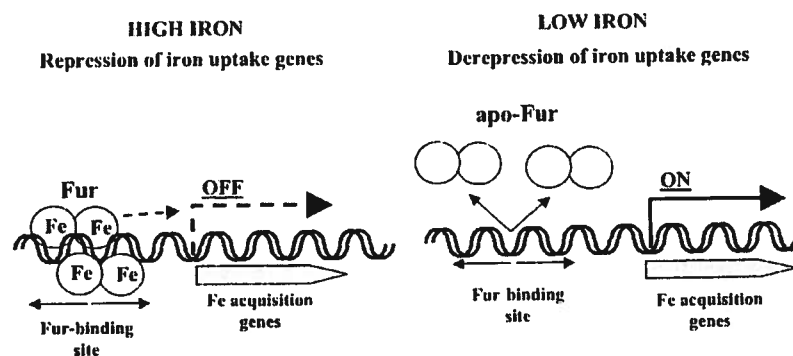
Le fer est un élément essentiel pour la majorité des microorganismes. Il participe à plusieurs processus physiologiques tels que la photosynthèse, la fixation d'azote, la respiration, le transport d'oxygène, la régulation génétique et la biosynthèse de l'ADN. Dans des conditions physiologiques, cet élément existe sous deux formes : la forme réduite ( $\text{Fe}^{2+}$  ferrique) et la forme oxydée ( $\text{Fe}^{3+}$  ferreux) (3). Le fer peut être toxique dans des conditions aérobiques, où l'oxygène ou des formes réduites de l'oxygène interagissent avec celui-ci. Les organismes doivent donc atteindre l'homéostasie en régulant leur capacité d'incorporer le fer, en maintenant un niveau adéquat pour leurs fonctions physiologiques et en gérant le niveau de fer afin d'éviter sa toxicité (3).

### 1.9.2 Régulateurs globaux

Il existe des régulateurs globaux qui peuvent contrôler l'expression d'une panoplie de gènes, que ce soit des gènes de virulence ou des gènes « housekeeping » (59). Parmi ceux-ci, on retrouve la « leucine responsive protein » (Lrp), la cAMP « receptor protein » (CRP), la « histone-like protein » (H-NS), le facteur sigma alternatif RpoS et le « ferric-uptake regulator » (Fur). Ces régulateurs sont impliqués dans la régulation de gènes de virulence ainsi que sur des gènes qui codent pour des composantes structurales ou des enzymes métaboliques (59). Ces régulateurs globaux peuvent aussi avoir un effet sur des éléments de régulation spécifiques, qui eux ensuite iront réguler l'expression de gènes particuliers.

### 1.9.2.1 Le régulateur global Fur

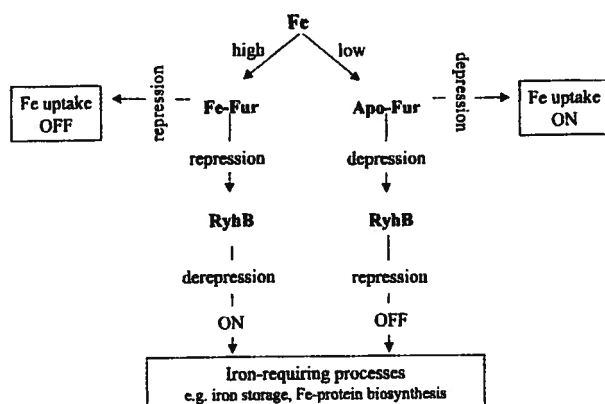
En général, les bactéries régulent leur métabolisme de fer selon la quantité de fer disponible. Cette régulation se fait chez *E. coli* par la protéine Fur (« ferric-uptake regulator ») qui contrôle l'expression de plus de 90 gènes (57). Fur est un homodimère composé de sous-unités de 17 kDa qui agit en tant que répresseur positif. En présence de fer, un ion ferreux agissant en tant que co-répresseur se lie à chaque sous-unité de Fur, et le complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur réprime la transcription. Lorsque le fer est absent, il y a dérépression des gènes régulés par Fur (3) (Fig. 1.6). Des études de « DNA-footprinting » de différents promoteurs régulés par Fur ont révélé une séquence consensus de liaison du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur, appelé « Fur box », ayant la séquence suivante : GATAATGATAATCATTATC. Par contre cette séquence exacte n'est retrouvée à aucun endroit dans le génome de *E. coli* et les sites de liaison de Fur peuvent correspondre à seulement 11 des 19 nucléotides de la séquence consensus (57). En utilisant des matrices de similarité basées sur des sites connus de liaison de Fur, plus de 36 sites de liaison potentiels ont été retrouvés dans le génome de *E. coli* K-12 (141).



**Figure 1.6.** Représentation schématique de la répression génique médiée par Fur. Adapté de Andrews *et al.* (3).

Fur régule l'expression des gènes d'acquisition de fer et de biosynthèse des sidérophores. Ainsi, afin d'éviter un niveau intracellulaire trop élevé de fer, ces systèmes sont réprimés lorsque sa présence est suffisante (57). En faisant un profil transcriptionnel génomique, 101 gènes ont été identifiés comme étant régulés par le complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur chez *E. coli* K-12, où 53 parmi ceux-ci étaient réprimés tandis que 48 étaient induits. Ces gènes sont impliqués dans différentes fonctions dont le métabolisme du fer ou d'autres métaux, la production d'énergie, le métabolisme des acides nucléiques, le stress ou la régulation de la production de protéines de la membrane externe (101).

L'expression de certains gènes de *E. coli* est donc induite par le fer de façon Fur-dépendante. Par contre, cette régulation par Fur est indirecte car ces gènes ne possèdent pas de « Fur box » (57). Le gène de ferritine (*pfr*) de *H. pylori* est le seul qui est induit par le fer par une interaction directe avec Fur, où apo-Fur se lie à son promoteur mais lors de la formation du complexe  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur, il y a dérepression de *pfr* (28). Un autre mécanisme de régulation positif dépendant de Fur implique un petit ARN, nommé RyhB, qui en présence de fer agit en tant que régulateur négatif de gènes tels que *acnA*, *bfr*, *ftnA*, *sdh* et *sodB* (97) (Fig. 1.7). En présence de fer, RyhB est réprimé par  $\text{Fe}^{2+}$ -Fur et les gènes mentionnés ci-haut sont induits. Le niveau auquel agit RyhB, soit transcriptionnel ou dans la stabilité du transcrit, n'est pas connu.



**Figure 1.7.** Modèle d'interaction entre Fur et RyhB pour réguler l'utilisation du fer. Adapté de Masse *et al.* (97).

### 1.9.3 Régulation de l'expression des fimbriae

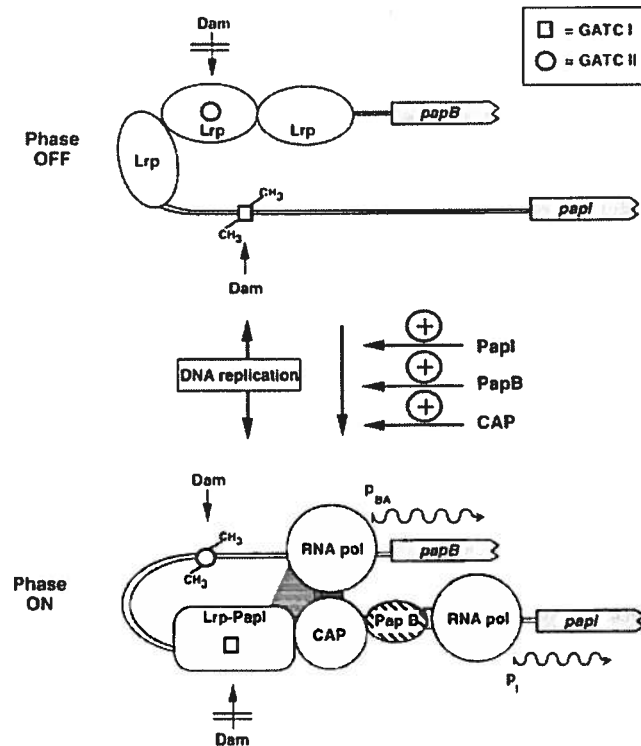
L'expression de fimbriae peut soit être uniforme ou subir la variation de phase. Lors de ce dernier cas, l'expression des fimbriae varie de façon réversible entre deux états : l'expression (« on ») et pas d'expression (« off »). Le niveau de transcription des mécanismes de contrôle uniformes ou de variation de phase peut quand même être affecté par des signaux environnementaux (90). Prenons deux exemples de fimbriae chez *E. coli* dont l'expression est sujette à la variation de phase, les fimbriae P et des fimbriae de type 1. Les mécanismes de variation de phase de ces deux fimbriae différent et sont décrits ci-dessous.

#### 1.9.3.1 Variation de phase des fimbriae P

La variation de phase chez l'opéron *pap* est contrôlée au niveau transcriptionnel (20) par un mécanisme épigénétique complexe impliquant la formation de motifs spécifiques de méthylation de l'ADN. La liaison du régulateur global Lrp ( « Leucine-Responsive Regulatory Protein » ) aux séquences régulatrices de *pap* est contrôlée par la méthylation de l'ADN, dont deux sites GATC, GATC-I et GATC-II, qui sont situés dans la région de régulation *pap* (Fig. 1.8). De plus, le co-régulateur PapI, codé par l'opéron *pap*, contrôle la liaison de Lrp à l'ADN de la région régulatrice de *pap* (76, 117, 118). PapI se lie avec une très haute spécificité aux complexes Lrp-ADN *pap*, mais ne se lie que faiblement aux molécules Lrp libres. PapI et Lrp interagissent une avec l'autre. Ainsi, PapI faciliterait la translocation entre les états transcriptionnels « on » et « off » par sa liaison à Lrp et en modifiant son affinité pour les régions GATC-I et GATC-II de *pap* (76). PapI réduit l'affinité de Lrp pour la région GATC-II et augmente l'affinité de Lrp pour la région GATC-I suite à la réplication (76, 117). PapI pourrait, en se liant au complexe Lrp-ADN *pap*, modifier la conformation de Lrp, ce qui hausserait son affinité pour les sites 4 et 5 autour de GATC-I (76).

L'expression de *pap* est aussi régulée par la source de carbone, où la protéine activatrice de catabolite (CAP) stimule la transcription de *papI* (48, 52). La protéine régulatrice PapB active aussi la transcription de *papI* (47).

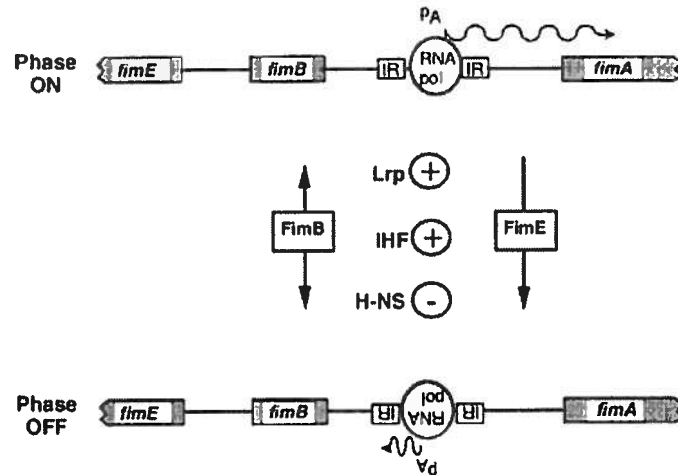




**Figure 1.8.** Le modèle de variation de phase de *Pap*. Les états de transcription actifs (phase « on ») et inactifs (phase « off ») de *pap* sont démontrés. La transition entre ces deux états de transcription requiert la réplication de l'ADN. Les sites GATC-I et GATC-II sont représentés par un carré et un cercle respectivement. La méthylation des sites GATC dans les états « on » et « off » est indiquée par « -CH<sub>3</sub> ». En plus des gènes *papI* et *papB*, les protéines impliquées dans la régulation transcriptionnelle de *pap* sont démontrées. Dam, méthylase deoxyadénosine; RNA pol, holoenzyme ARN polymérase; Lrp-PapI, complexe entre les protéines régulatrices Lrp et PapI. Les endroits hachurés indiquent des interactions putatives entre les protéines régulatrices et l'ARN polymérase. Les sites de départ de la transcription *papBA* et *papI* sont démontrés par des lignes ondulées. Adapté de Low *et al.* (90).

### 1.9.3.2 Variation de phase des fimbriae de type 1

La variation de phase chez les fimbriae de type 1, codés par l'opéron *fim*, se fait par un mécanisme de recombinaison indépendant de RecA. Ce mécanisme se fait par inversion d'une séquence de 314 pb qui contient le promoteur de *fimA* (Fig. 1.9) (1). Les gènes *fimB* et *fimE* codent pour des protéines ayant de l'homologie avec des recombinases site-spécifiques (78, 124). *fimE* semble favoriser l'inversion du fragment d'ADN de l'orientation « on » à « off » tandis que *fimB* favorise l'inversion dans les deux orientations (99, 100). Plusieurs facteurs de régulation globaux affectent l'expression des fimbriae de type 1. Le « integration host factor » (IHF) est nécessaire pour l'inversion car il a un rôle dans la recombinaison site-spécifique et il est possible qu'il module la transcription de *fimB* et de *fimE* (32, 42). La protéine H-NS semble réprimer le changement entre les deux phases de *fim* tandis que Lrp stimule la variation de phase dans les deux directions (19, 77).



**Figure 1.9.** Le modèle de variation de phase des fimbriae de type 1. Les états de transcription actifs (phase ouverte « on ») et inactifs (phase fermée « off ») de *fim* sont démontrés. La région du « inverted repeat » (IR) est composée de la séquence de 9 pb «TTGGGGCCA», qui se retrouve de part et d'autre d'un fragment d'ADN de 314 pb qui contient le site d'initiation de la transcription  $p_A$ . Le gène *fimA* code pour la sous-unité majeure, tandis que *fimB* et *fimE* codent pour les gènes de régulation requis pour la variation de phase inversion-dépendante. L'effet de Lrp, IHF et la protéine « histone-like » H-NS sur l'inversion de *fim* est démontrée. Adapté de Low *et al.* (90).

## Chapitre 2

### Résultats préalables

#### 2.1 PCR multiplex de six clones *ecs*

Les souches APEC, une des principales causes de morbidité et de mortalité chez les poulets et les dindes, sont responsables de grandes pertes économiques à l'industrie avicole (56). Aucune souche APEC n'a été séquencée à ce jour, mais des régions d'ADN uniques à la souche APEC  $\chi 7122$ , qui sont absentes de la souche *E. coli* K-12  $\chi 289$ , ont été identifiées (23). De plus, la méthode de SCOTS a permis d'identifier des séquences uniques à la souche  $\chi 7122$ , les *ecs* (*E. coli* captured sequences), exprimées *in vivo* lors de l'infection chez le poulet (36). Puisque certaines de ces régions uniques peuvent être des facteurs de virulence, nous avons voulu vérifier s'il y a une association entre la présence de ces séquences et la virulence des souches *E. coli* dans lesquelles elles se retrouvent.

Parmi les transcrits exprimés *in vivo* par la méthode de SCOTS (36), six clones *ecs* pathospécifiques, absents de la souche de *E. coli* K-12, ont été choisis pour déterminer leur distribution parmi différentes souches de *E. coli*. La présence de ces séquences a été déterminée par PCR chez des souches faisant partie des groupes suivants : la collection ECOR, pathogènes aviaire (APEC), environnement des oiseaux, et uropathogènes humains. Les souches ont été cultivées sur du Tryptic soy agar (TSA) à partir de stocks congelés dans 25% glycérol et elles ont ensuite été incubées dans du milieu LB pendant la nuit à 37°C. Un culot de 125  $\mu$ L de chaque culture a été utilisé pour faire une lyse alcaline avec les solutions stériles suivantes : 25  $\mu$ L NaOH 0.5M, 25  $\mu$ L Tris-HCl 1M pH 7.4, 450  $\mu$ L H<sub>2</sub>O distillée. Les lysats des souches ont été rassemblés en groupes de 3 à 6 souches (Tableau 2.1). Deux PCR multiplex, chacun avec trois paires d'amorces (Tableau 2.2), ont été faits à chaque groupe de souches. Les conditions de PCR étaient les suivantes : 95°C pour 1 min suivi de 30 cycles à 94°C pour 30 sec, 60°C pour 30 sec et 72°C pour 1 min et ensuite une extension à 72°C 1 min. La souche  $\chi 7122$  a été utilisée comme contrôle positif pour l'amplification de toutes les six séquences et les contrôles négatifs utilisés étaient la souche de *E. coli* K-12  $\chi 289$  et de l'eau. Un

exemple de résultats obtenus par PCR sur gel d'agarose est montré à la figure 2.1. Les résultats de toutes les réactions de PCR multiplex sont rassemblés dans le tableau 2.3.

**Tableau 2.1.** Souches de *E. coli*<sup>1</sup> provenant de différents contextes cliniques, rassemblés en groupes pour les réactions de PCR multiplex.

|               |              |               |        |                 |
|---------------|--------------|---------------|--------|-----------------|
| <b>APEC-1</b> | <b>ENV-1</b> | <b>UHUM-1</b> |        | <b>ECOR A1</b>  |
| 56            | TK105        | H15           | V24    | 3               |
| TK12          | TK119        | PM6           | H19    | 6               |
| 137           | TK99         | 2P6           |        | 8               |
| TK1           | TK78         | V6            |        | 11              |
| 3             | TK76         |               |        | 22              |
| <b>APEC-2</b> | <b>ENV-2</b> | <b>UHUM-2</b> |        | <b>ECOR A2</b>  |
| 151           | C80          | PM8           | V19    | 14              |
| 144           | C97          | V31           | V22    | 15              |
| 138           | C113         | PM4           | CFT073 | 17              |
| 140           | C107         | H26           |        | 19              |
| 71            | C75          |               |        | 21              |
| <b>APEC-3</b> | <b>ENV-3</b> | <b>UHUM-3</b> |        | <b>ECOR B1</b>  |
| 40            | C128         | H5            |        | 27              |
| 139           | C29          | V21           |        | 33              |
| 154           | C114         | 2H19          |        | 45              |
| 33            | C65          | V29           |        | 67              |
| 27            | C125         | PM7           |        | 71              |
| <b>APEC-4</b> | <b>ENV-4</b> | <b>UHUM-4</b> |        | <b>ECOR B2</b>  |
| 30            | C111         | U6            | PM9    | 51              |
| 163           | C108         | H27           | V9     | 56              |
| 49            | C92          | U1            |        | 60              |
| 165           | C109         | V28           |        | 62              |
| 14            | C82          |               |        | 64              |
| <b>APEC-5</b> | <b>ENV-5</b> | <b>UHUM-5</b> |        | <b>ECOR D</b>   |
| 69            | TK101        | TK106         | V26    | 35              |
| 60            | TK112        | C67           | V32    | 38              |
| 9             | C115         |               | 2P9    | 40              |
| 61            | C121         |               | H17    | 48              |
| TK2           |              |               | CP9    | 50              |
| <b>APEC-6</b> | <b>ENV-6</b> |               |        | <b>ECOR non</b> |
| MT513         | MT181        | C120          | C126   | 31              |
| MT512         | MT458        | C110          | C129   | 37              |
| MT78          |              | C64           |        | 42              |
| MT515         |              | C63           |        | 43              |

<sup>1</sup> Le nom de chaque groupe est indiqué en gras. APEC : souches pathogènes aviaires; ENV : souches de l'environnement des oiseaux; UHUM: souches uropathogènes humains; ECOR : souches de la collection de référence de *E. coli*. Le groupement de la collection ECOR est basé sur les groupes phylogénétiques connus (69).

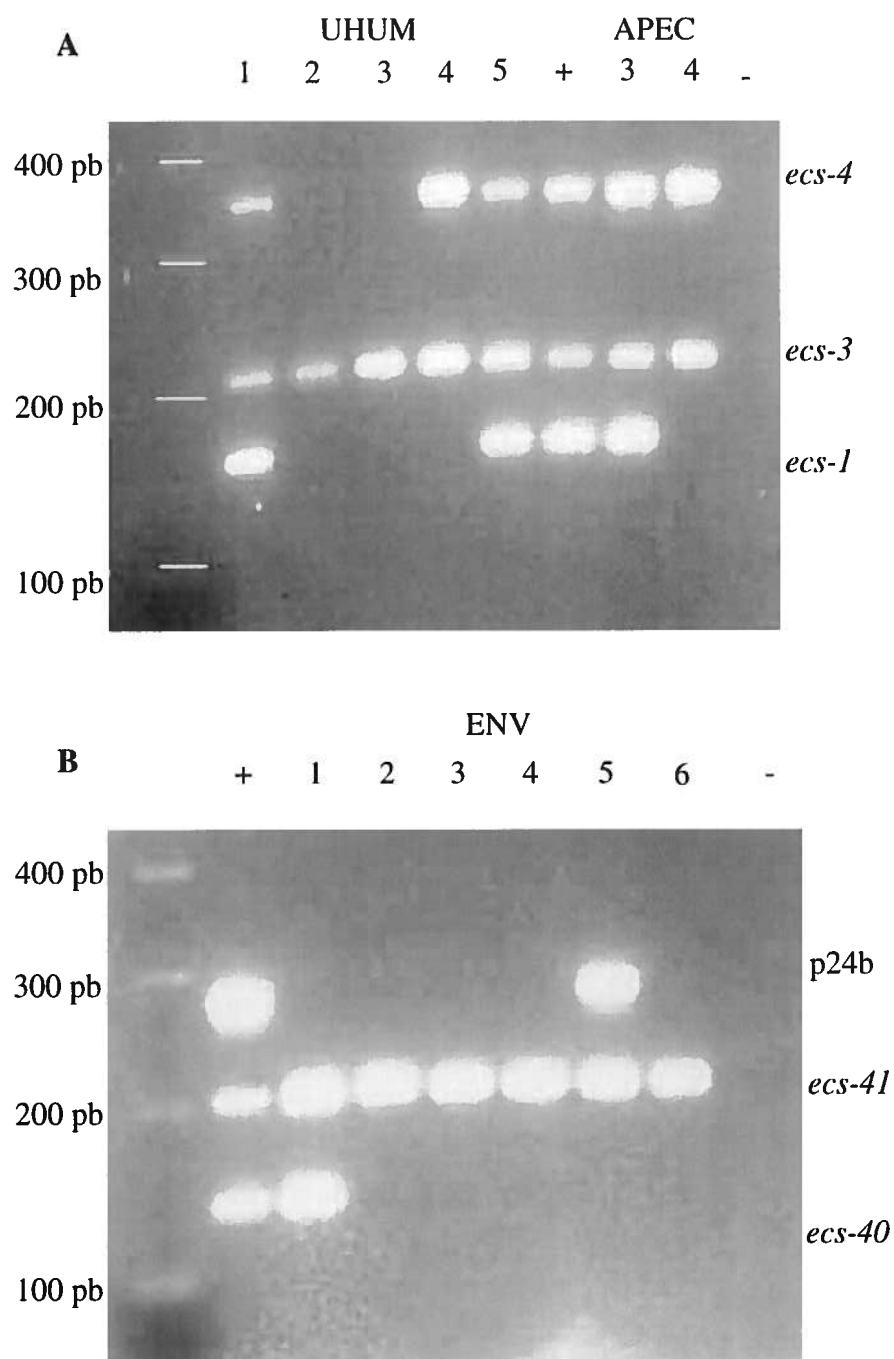
**Tableau 2.2.** Séquences des amorces spécifiques aux six clones *ecs*<sup>3</sup> utilisées dans les réactions de PCR multiplex.

| Amorce             | Séquence de l'amorce                                      | Fragment amplifié (pb) <sup>1</sup> | Température d'hybridation (°C) <sup>2</sup> |
|--------------------|-----------------------------------------------------------|-------------------------------------|---------------------------------------------|
| Ecs1-F<br>Esc1-R   | 5'-GGGCTTCATTGAAAGTGTCA-3'<br>5'-AGACTCATTGAGAACAGCAAT-3' | 156                                 | 55                                          |
| Esc3-F<br>Ecs3-R   | 5'-TCTGGTTCACATACACTACG-3'<br>5'-CCAATCATAATCTGGCTTCT-3'  | 208                                 | 55                                          |
| Ecs4-F<br>Ecs4-R   | 5'-CAGGGTTAATTGATGGTTGG-3'<br>5'-GAAGGGCGACCAGCTGC-3'     | 353                                 | 55                                          |
| Esc41-F<br>Ecs41-R | 5'-GCCACGCGGGTGATGGATTT-3'<br>5'-CGATGTGCGATGGTGCCAGA-3'  | 204                                 | 56                                          |
| Ecs40-F<br>Ecs40-R | 5'-CGATTCACCGTCGTCGGTGT-3'<br>5'-CAATGCGTTGTCCGGCGTAG-3'  | 138                                 | 56                                          |
| P24B-F<br>P24B-R   | 5'-CGAGAATTATCAGCAGCTTC-3'<br>5'-CCCTGTTTAGAACATCCTGA-3'  | 280                                 | 56                                          |

<sup>1</sup> Taille du fragment amplifié avec les amorces indiquées par PCR.

<sup>2</sup> Température d'hybridation utilisée pour le PCR. Les amorces avec la même température d'hybridation ont été groupées dans la même réaction de PCR multiplex.

<sup>3</sup> La fonction des homologues de chaque clone *ecs* selon Dozois *et al.* (36) sont les suivants : *ecs-1*, assemblage de pili; *ecs-3*, « usher » fimbriaire putatif; *ecs-4*, sous-unité fimbriaire putative; *ecs-41*, oxidoréductase putative; *ecs-40*, mandelate rasemase putative; p24b, fonction inconnue.



**Figure 2.1.** Réactions de PCR multiplex sur gel d'agarose 2%. (A) Groupe 1 à 5 des souches uropathogènes humaines (UHUM 1 à 5) et groupes 3 et 4 des souches pathogènes aviaires (APEC 3 et 4). (B) Groupes 1 à 6 des souches de l'environnement des oiseaux (ENV 1 à 6). Les premiers puits contiennent l'échelle de poids moléculaire. Le nom de chaque séquence *ecs* amplifiée est indiqué à droite. Contrôle + : APEC  $\chi$ 7122; contrôle - : *E. coli* K-12  $\chi$ 289.



**Tableau 2.3.** Résultats des PCR multiplex sur des groupes de souches de *E. coli*.

| Groupes de souches<br>de <i>E. coli</i> <sup>1</sup> | Présence de chaque séquence <sup>2</sup> |              |              |               |               |      |
|------------------------------------------------------|------------------------------------------|--------------|--------------|---------------|---------------|------|
|                                                      | <i>ecs-1</i>                             | <i>ecs-3</i> | <i>ecs-4</i> | <i>ecs-41</i> | <i>ecs-40</i> | p24b |
| ECOR A1                                              | -                                        | -            | +            | +             | -             | -    |
| ECOR A2                                              | -                                        | -            | +            | +             | -             | -    |
| ECOR B1                                              | -                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
| ECOR B2                                              | -                                        | -            | -            | +             | -             | -    |
| ECOR D                                               | -                                        | +            | -            | +             | -             | -    |
| ECOR non                                             | -                                        | -            | -            | +             | -             | -    |
|                                                      |                                          |              |              |               |               |      |
| APEC 1                                               | -                                        | -            | -            | +             | -             | -    |
| APEC 2                                               | -                                        | +            | -            | +             | -             | -    |
| APEC 3                                               | +                                        | +            | +            | +             | +             | -    |
| APEC 4                                               | +                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
| APEC 5                                               | -                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
| APEC 6                                               | +                                        | +            | +            | +             | +             | -    |
|                                                      |                                          |              |              |               |               |      |
| UHUM 1                                               | +                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
| UHUM 2                                               | -                                        | +            | -            | +             | -             | -    |
| UHUM 3                                               | -                                        | +            | -            | +             | -             | -    |
| UHUM 4                                               | -                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
| UHUM 5                                               | +                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
|                                                      |                                          |              |              |               |               |      |
| ENV 1                                                | -                                        | +            | +            | +             | +             | -    |
| ENV 2                                                | -                                        | -            | -            | +             | -             | -    |
| ENV 3                                                | -                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
| ENV 4                                                | -                                        | +            | +            | +             | -             | -    |
| ENV 5                                                | -                                        | +            | +            | +             | -             | +    |
| ENV 6                                                | +                                        | +            | +            | +             | -             | -    |

<sup>1</sup> Les souches appartenant à chaque groupe sont indiquées au tableau 2.

<sup>2</sup> La présence de chaque séquence a été déterminée par PCR en utilisant les amorces spécifiées au tableau 2.2.

## 2.2 Conclusion

Suite au criblage de plusieurs groupes de souches de *E. coli* par PCR, aucune séquence *ecs* n'a pu être associée à des souches pathogènes plutôt qu'à des souches non-pathogènes. La séquence p24b a été retrouvée dans seulement un groupe des souches et la séquence *ecs-41* a été retrouvée dans tous les groupes testés. Pour ce qui en est des séquences *ecs-1*, *ecs-3*, *ecs-4* et *ecs-40*, on les retrouve autant dans les souches pathogènes que dans les souches non-pathogènes. Puisqu'aucune de ces séquences semble être patho-spécifique, nous avons choisi de caractériser la séquence *ecs-3*.

## Chapitre 3

### Article scientifique

#### 3.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été réalisés par Maria Lymberopoulos sous la supervision de Dr Charles Dozois. Les essais d'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales humaines ont été effectués par l'étudiante sous la supervision de Dr France Daigle à son laboratoire à l'Université de Montréal. La construction des mutants *lacZYA* des souches  $\chi$ 7122 et  $\chi$ 289, utilisés pour certains des essais de régulation de la transcription, ont été faits par Simon Léveillé. La détection de *irfC* par PCR chez les 298 souches APEC a été effectuée par Annie Brée au laboratoire de Maryvonne Moulin-Schouleur. James R. Johnson a fourni les souches de la collection ECOR et les souches ExPEC.

### **3.2 Article : Characterization of an iron-regulated (IR) fimbrial adhesin, and distribution among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains**

Maria H. Lymberopoulos<sup>1</sup>, France Daigle<sup>2</sup>, Simon Léveillé<sup>1</sup>, Annie Brée<sup>3</sup>,  
Maryvonne Moulin-Schouleur<sup>3</sup>, James R. Johnson<sup>4</sup>, and Charles M. Dozois<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, CANADA

<sup>2</sup> Dept. of Microbiology & Immunol. Univ. of Montréal, Montréal, CANADA

<sup>3</sup> INRA- Centre de Tours, UR86, Pathologie Bactérienne, 37380 Nouzilly, FRANCE

<sup>4</sup> Mucosal and Vaccine Research Center, VA Medical Center, and Department of  
Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, MN, U. S. A.

\*Corresponding Author:

Charles M. Dozois

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, CANADA H7V 1B7

Phone: 450-687-5010 ext. 4221 Fax: 450-686-5501

e-mail: [charles.dozois@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:charles.dozois@inrs-iaf.quebec.ca)

### 3.2.1 Abstract

Pathogenic strains of *Escherichia coli* possess adhesins, sometimes absent in non-pathogenic strains, which may facilitate colonization of specific host cells or tissues. A unique sequence in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain  $\chi$ 7122, identified as *ecs-3*, was found in a recent study to be expressed *in vivo* in infected chicken tissues. Analysis of this sequence revealed a fimbrial gene cluster with homology to long polar (LP) fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Escherichia coli* O157:H7. This fimbrial gene cluster, termed *irf* for iron-regulated fimbriae, is a member of a distinct group of related fimbriae that are located in the *glmS-pstS* intergenic region of certain *E. coli* and *S. enterica* strains. Herein, we demonstrate that *irf* sequences are phylogenetically distributed among *E. coli* reference strains and clinical isolates from human urinary tract infections. Furthermore, *irf* is associated with APEC strains and in particular is common in O78 isolates. IR fimbriae contributed to adherence of a non-fimbriated *E. coli* K-12 strain to human bladder and intestinal epithelial cells and to avian lung and tracheal tissues in adhesion assays. Under the control of the pBAD promoter, the fimbriae were visualized by electron microscopy in a normally nonfimbriated *E. coli* K-12 strain. Transcriptional regulation assays suggest that *irf* expression is increased in minimal media and that iron and the global regulator Fur play a role in the regulation of *irf* expression.

### 3.2.2 Introduction

*Escherichia coli* is a diverse species that is both part of the commensal flora and is capable of causing a variety of diseases in humans and other animals. Pathogenic *E. coli* exhibit different host and tissue specificities (19). Some strains are responsible for intestinal diseases; examples are enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) that cause travelers' diarrhea, enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) associated with hemolytic uremic syndrome or hemorrhagic colitis, and enteropathogenic *E. coli* (EPEC) causing watery diarrhea in children and animals (41). Other pathotypes are responsible for a variety of extra-intestinal diseases such as urinary tract infections (UTIs), meningitis, and septicemia, and thus have been termed extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (58). Studies have shown that *E. coli* populations have a clonal structure, and *E. coli* strains belong to specific clonal groups or lineages (36, 44). The genetic diversity within the *E. coli* species can be represented by the *E. coli* reference (ECOR) collection, which is a set of 72 *E. coli* strains from different hosts, clinical contexts, and regions (44). Phylogenetic analyses of the ECOR collection using multilocus enzyme electrophoresis (MLEE) divide strains into 4 main phylogenetic groups, A, B1, B2 and D. Strains belonging to group B2 or D are responsible for most urinary tract and other extra-intestinal infections. This is thought to be due to the virulence determinants often carried by these two groups that are usually absent from members of groups A and B1 (70).

Avian pathogenic *E. coli* (APEC) are associated mainly with extra-intestinal diseases in chickens, turkeys, and other avian species, and cause severe economic losses to the poultry industry (16). The most common form of these diseases is avian colibacillosis, which starts as an initial respiratory infection (airsacculitis), and is frequently followed by generalized infections such as perihepatitis, pericarditis, and septicemia (16). APEC belong to a limited number of serogroups, of which O1, O2, and O78 are the most common worldwide (16). Over 83 percent of tested APEC isolates fall into 5 distinct clonal groups (67). Several virulence factors have been described in APEC such as adhesins, iron sequestering systems, capsular and lipopolysaccharide antigens, and toxins (32).

Although many virulence factors are required to cause disease in a host, adhesin-mediated colonization of different tissues is one of the earliest events occurring during infection. Adhesins are either assembled into hair-like appendages (fimbriae or pili) or are directly associated with the bacterial cell surface (non-pilus adhesins) (63). Several adhesins have been described so far in APEC, and include type 1 (F1), P (F11), and AC/I (avian *E. coli* I) fimbriae, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh) (16, 32). P fimbriae have mostly been described on human uropathogenic *E. coli* and are present in only a minority of APEC isolates (16, 32). Expression of P fimbriae in the air sacs and other internal organs but not in the trachea of inoculated chickens supports the idea that they are important only in later stages of infection (52). Type 1 fimbriae are characterized by their ability to adhere to D-mannose residues of epithelial cells and mucosa (28). They were shown to be expressed by bacteria colonizing the respiratory tract of experimentally infected chickens (18), and may contribute to initial colonization of the avian respiratory tract (16, 52). AC/I fimbriae, which belong to the S-fimbrial adhesin family, mediate adherence to avian epithelial tissues *in vitro* and *in vivo* and have been found on a limited number of O78 APEC isolates (2, 69). Curli are thin coiled aggregative structures found on the surface of most *E. coli* isolates (32). Curli promote binding to such surface structures as laminin, plasminogen, fibronectin, and major histocompatibility complex (MHC) class I molecules (45-47, 61), and also agglutinate chicken erythrocytes (11). Curli are associated with biofilm formation (57) and curli cloned from an APEC O78 strain mediated internalization of *E. coli* K-12 by eukaryotic cells (22). Tsh, a temperature-sensitive hemagglutinin, identified on the APEC strain  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9) (54), was shown to be associated with pathogenic isolates of high lethality for day-old chicks (21). Experimental infection studies showed that although Tsh contributes to the development of lesions in the air sacs, other virulence factors must contribute to the pathogenicity of strain  $\chi$ 7122 in the lower respiratory tract and extra-respiratory tissues (21).

Recently, a number of putative adhesin-encoding genes of strain  $\chi$ 7122 that were expressed *in vivo* in chicken tissues were identified by selective capture of transcribed sequences (SCOTS) (20). One of the pathogen-specific fragments identified (*ecs-3*) shared homology at the peptide level with putative fimbrial ushers present in *E. coli*

O157:H7 and *Salmonella enterica* serovar Typhi (*S. typhi*). These related fimbrial gene clusters are located between the conserved genes *glmS* and *pstS*. These fimbriae also share some similarities with the long polar (LP) fimbriae of *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) and *E. coli* strains EDL933 O157:H7 and 83/39 (5, 42, 64), each of which are encoded by operons located between the conserved genes *yhjY* and *yhjW*. This report describes the identification and characterization of the fimbrial gene cluster corresponding to fragment *ecs-3* of APEC strain  $\chi$ 7122. We have termed the genes encoding this fimbriae *irf*, for iron-regulated fimbriae, to reflect the regulatory effect of iron on expression of the fimbrial operon.

### 3.2.3 Materials and methods

**3.2.3.1 Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions.** Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 3.1. In addition, selected clinical or environmental isolates from various sources were used to screen for the presence of *irfC*. The 72 members of the *Escherichia coli* reference (ECOR) collection represent a diversity of *E. coli* strains that have been phylogenetically grouped by MLEE (44). The 298 APEC clinical isolates were described elsewhere (21). Thirty-two *E. coli* fecal isolates from healthy poultry were kindly provided by Dr. John M. Fairbrother (Université de Montréal). APEC and avian *E. coli* environmental isolates were previously classified for virulence based on lethality for 1-day-old chicks following subcutaneous inoculation, where LC1 corresponds to the high-lethality class, LC2 to the low-lethality class, and LC3 to the non-lethal class (21). Among the total number of APEC isolates tested, the serogroup of 187 isolates was determined. Human ExPEC isolates included a diversity of strains from urosepsis and other extraintestinal sources. These strains were grouped phylogenetically by either MLEE or a multiplex PCR method (13). Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth (Gibco) or on Tryptic soy agar (TSA) (Gibco) at 37°C. Additional media used were MacConkey agar (Gibco), M9 medium (39) and Nutrient Broth (NB) (Gibco). When required, antibiotics were added at the following concentrations: kanamycin (Km), 50 µg/ml; ampicillin (Ap), 100 µg/ml; chloramphenicol (Cm), 50 µg/ml, and nalidixic acid, 15 µg/ml. For plasmid pBAD18-Cm and its



derivative, chloramphenicol was used at a concentration of 10 µg/ml. Transformation of *E. coli* strains was routinely done by using the calcium/manganese based (CCMB) or electroschock methods as described (25).

**3.2.3.2 DNA and genetic manipulations.** Standard methods were used for isolation of bacterial genomic DNA, DNA manipulation, and cloning (59). Restriction enzymes and DNA ligase used in this study were purchased from New England Biolabs (NEB), Invitrogen, or Amersham-Pharmacia and used according to the suppliers' recommendations. Recombinant plasmids, PCR products, and restriction fragments were purified using plasmid mini-prep, PCR clean-up, and gel extraction kits (Qiagen) as recommended by the supplier.

**3.2.3.3 Identification, cloning and sequencing of the *irf* gene cluster.** The *irf* gene cluster was amplified from genomic DNA of strain  $\chi$ 7122 using Elongase<sup>®</sup> enzyme mix (Invitrogen Life Technologies) with the primers glmS-F (5'-GATCTTCTACACCGTTCCGC-3') and pstS-R (5'-TTACGCCACCGGAAGAACCG-3'). The 5.8 kb PCR product was purified and cloned into vector pCR-XL-TOPO using the TOPO<sup>®</sup>XL PCR cloning kit (Invitrogen) resulting in plasmid pIJ2. The cloned fragment was subcloned from pIJ2 into vector pACYC184 at the *Xba*I and *Hind*III restriction sites, resulting in vector pIJ14, which was then transformed into strain MG1655. Sequencing was achieved by generation of transposon mutants by transduction using phage $\lambda$ ::Tn5seq1 (40), a derivative of Tn5 that contains universal T7 and SP6 sequencing primers at its extreme ends, as described elsewhere (15). Total plasmid DNA of the transductants was isolated and transformed into CCMB-competent DH5 $\alpha$  cells. Location of the Tn5seq1 insertions was determined by PCR using primer Tn5seq1-left (5'AAGCTCGGATCTAATACGAC-3') located within the transposon and primers glmS-F and pstS-R. Restriction enzyme digestions with *Not*I were also performed to determine the location of Tn5seq1 insertions. Selected pIJ14::Tn5seq1 clones were sequenced by DNA landmarks Inc. (St. Jean sur Richelieu, QC, Canada) using universal primers T7 and SP6.

**3.2.3.4 Distribution of the *irf* operon among *E. coli* strains.** The presence of the *irf* operon was investigated among different *E. coli* strains. Crude DNA extracts of strains were prepared by alkaline lysis. Primers specific to the putative usher encoding gene *irfC*, *irfC*-F (5'-TCTGGTTCACATACACTACG-3') and *irfC*-R (5'-CCAATCATAATCTGGCTTCT-3'), were used for screening, as the coding sequence of the usher genes are typically conserved within a fimbrial type which may comprise a number of variant major subunit alleles (29, 33). PCR conditions were as follows: 95°C for 1 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min, and then an extension period of 72°C for 1 min. The reactions were carried out using Taq DNA polymerase (NEB). Specificity of the primers was confirmed by successful amplification of the 208 bp fragment in strain  $\chi$ 7122 and no amplification in strains known not to contain the *irf* operon based on their genome sequences; MG1655, CFT073, and EDL933.

**3.2.3.5 Bacterial association with human epithelial cells.** The ability of ORN103 and ORN103(pIJ2) to adhere to epithelial cell monolayers was assessed using human bladder derived (UM-UC-3), and human intestinal derived (INT407) epithelial cell lines. For both quantitative and qualitative assays, epithelial cells were grown to semi-confluence (about  $3.5 \times 10^5$  cells/ml) in RPMI medium supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and were rinsed three times before the adherence assays. Bacteria were grown overnight on TSA plates containing kanamycin, and were resuspended in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, to an OD<sub>600</sub> of 0.6 ( $\approx 3 \times 10^8$  CFU). Approximately  $10^6$  CFU were added to each well. The 24-well plates were then centrifuged at 800 rpm for 5 min, incubated at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> for 90 min and rinsed three times. For quantitative assays, PBS-DOC 0.1% (deoxycholic acid sodium salt) was added to each well, and samples were diluted and spread on TSA plates containing kanamycin. Data are expressed as the percentage of the initial inoculum introduced. Assays were carried out in triplicate wells in two separate experiments. Statistical differences were assessed using Student's t-test. The same protocol was applied for qualitative assays on glass coverslips. However, after the final rinse to remove non-adherent bacteria, cells were fixed and stained using the Diff-Quick® stain set (Dade

Behring Inc.). Stained cells were viewed using a Nikon Eclipse E800 transmission light microscope equipped with a Nikon Coolpix 990 digital camera.

**3.2.3.6 Adherence assays to chicken tracheal and lung frozen sections.** Adherence assays were performed by using a method adapted from Nowicki *et al.* (43). Tracheal and lung tissues from two chickens were removed and frozen in Tissue-Tek O.C.T. compound (Sakura) at  $-80^{\circ}\text{C}$ . Tissues were cut in  $5\text{ }\mu\text{m}$  sections on glass slides using a cryostat (Miles 4553), and were fixed with methanol. For the adherence assay, bacteria were grown overnight on TSA plates with appropriate antibiotics and resuspended in PBS, pH 7.4 containing 1% (wt/vol) bovine serum albumin (PBS-1% BSA). Fifty  $\mu\text{l}$  of a  $5 \times 10^9$  bacterial suspension were added to the tissue sections which were incubated in a moist chamber at  $4^{\circ}\text{C}$  for 45 min. Slides were rinsed twice in PBS pH 7.4 for 5 min with gentle agitation, and were then fixed and stained using the Diff-Quick<sup>®</sup> stain set (Dade Behring Inc.). Adherence was viewed using the Nikon Eclipse E800 microscope equipped with a Nikon Coolpix 990 digital camera.

**3.2.3.7 Electron microscopy.** Production of *irf*-encoded fimbriae in an *E. coli* clone was examined by electron microscopy. The *irf* operon was placed under the control of the tightly regulated arabinose promoter of pBAD18-Cm. A 5142 bp PCR product from plasmid pIJ2 was amplified using the Elongase<sup>®</sup> enzyme mix (Invitrogen life technologies) and the following primers: NheI-F (5'-ATGCTAGCAAGTGATGATTC-ATGGTAAAGG-3') and HindIII-R (5'-TGTGAAGCTTAAAATCCCACATGTC-3'). The PCR purified product was then digested with *HindIII* and *NheI* and cloned into plasmid pBAD18-Cm. The resulting plasmid, pIJ39, and the control plasmid were transformed into the non-fimbriated *E. coli* K-12  $\Delta\text{fim}$  mutant strain ORN172. Bacteria were grown overnight on TSA plates containing 0.05% arabinose and  $10\text{ }\mu\text{g/ml}$  chloramphenicol at  $37^{\circ}\text{C}$ . Bacteria were allowed to adhere to a copper 200 mesh Formvar carbon-coated grid, and were negatively stained with 1% phosphotungstic acid, pH 6.0. The grids were allowed to dry before being analyzed with the Philips EM-300 electron microscope.

201 **3.2.3.8 Construction of *lacZYA* mutants of strains  $\chi$ 7122 and  $\chi$ 289.** Deletion of  
202 *lacZYA* genes in strains  $\chi$ 7122 and  $\chi$ 289 were performed using the lambda red  
203 recombinase system, as described by Datsenko and Wanner (14). The following primers  
204 containing regions homologous to terminal portions of *lacI* or *lacZ* were used to amplify  
205 the *cat* gene flanked by FRT sites from the template plasmid pKD3: LacIKO-F  
206 (5'-GCAGCGTATCAGGCAATTTTATAATTTAACTGACGTGTAGGCTGGAGC-  
207 TGCTTC-3') and LacZKO-R (5'-GGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGC-  
208 GCAACGCCATATGAATATCCTCCTTAG-3'). The gene disruption was carried out by  
209 electroschock transformation of strains  $\chi$ 7122 and  $\chi$ 289 carrying plasmid pKD46 with the  
210 PCR fragment containing the antibiotic resistance cassette. Mutants were colony purified  
211 once nonselectively at 37°C and then tested for the loss of the helper plasmid by selecting  
212 for ampicillin sensitivity. To eliminate the chloramphenicol resistance gene, resulting  
213 strains were transformed with pCP20. Ampicillin-resistant transformants were selected at  
214 30°C and a few were colony-purified non-selectively at 43°C. The strains were then tested  
215 for loss of all antibiotic resistances, the loss of pCP20, and the presence of all 4 native  
216 plasmids of strain  $\chi$ 7122. The  $\Delta$ *lacZYA* derivatives of strains  $\chi$ 7122 and  $\chi$ 289 were  
217 named QT51 and QT52 respectively.

218 **3.2.3.9 Measurement of  $\beta$ -galactosidase activity.** The *irfA* promoter region was  
219 amplified from plasmid pIJ2 using the Elongase<sup>®</sup> enzyme mix (Invitrogen life  
220 technologies) and the following primers: CMD56-F (5'-  
221 TAGGATCCAGCATTAGAGATGCCAGAG-3') and CMD57-R (5'-  
222 CGGAATTCAAAGGCACCGACGTTGAC-3'). The PCR product was digested with  
223 *EcoRI* and *BamHI* and cloned into pRS415, resulting in plasmid pIJ32. Strains QT51 and  
224 QT52 were transformed by electroschock transformation with plasmids pRS415 or pIJ32.  
225 Strains were grown for 18 hrs at 37°C, diluted 1:100 in fresh medium containing  
226 ampicillin and grown at 37°C to the exponential phase. The cultures were diluted 1:10 in  
227 Z buffer and assayed for  $\beta$ -galactosidase activity. The protocol for measuring  $\beta$ -  
228 galactosidase activity was as described by Miller (39). The assay using strains H1443 and  
229 H2331 was carried out in Nutrient broth containing the following amino acids at their  
230 appropriate concentrations: L-histidine (22 mg/L), L-leucine (20 mg/L), L-proline

(30 mg/L), L-tryptophan (20 mg/L), and thiamine (1 mg/L), with either 0  $\mu$ M, 10  $\mu$ M or 30  $\mu$ M of added iron ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ) and ampicillin. Results represent data tested in triplicate experiments and are expressed as Miller units (39).

**3.2.3.10 Nucleotide sequence accession number.** The nucleotide sequence of the *irf* encoding region of strain  $\chi$ 7122 has been assigned GenBank accession no. AY530785.

## **3.2.4 Results**

### **3.2.4.1 Identification of the *irfABCD* gene cluster and phylogenetic relationship with other fimbrial gene clusters.**

Pathogen-specific transcripts of strain  $\chi$ 7122 were previously identified in a chicken infection model by Dozois *et al.* (20). Transcript *ecs-3* shared sequence homology at the peptide level with the putative fimbrial ushers StgC of *S. typhi* strain CT18 and Z5222 of *E. coli* O157:H7 (50, 51). In *S. typhi* strain CT18 and *E. coli* O157:H7 strain EDL933 *stgC* and gene Z5222 respectively are part of putative fimbrial operons located between the conserved genes *glmS* and *pstS* corresponding to the 84 min region of *E. coli* K-12 (Fig. 3.1A). By using primers corresponding to *glmS* and *pstS*, a 5842 bp DNA fragment was amplified from strain  $\chi$ 7122 genomic DNA and cloned. Sequencing of the region led to the identification of a fimbrial gene cluster that we have termed *irf*, for iron-regulated (IR) fimbriae. The *irf* gene cluster is nearly identical (99.5% nucleic acid identity) to a recently described *lpf*-related fimbrial operon of *E. coli* O113:H21 that has been termed *lpf*<sub>O113</sub> based on identity shared with proteins comprising long polar (LP) fimbriae of *S. typhimurium* (17, 49). The *irfABCD* gene cluster of strain  $\chi$ 7122 contains four ORFs, whose predicted protein product sizes are shown in Fig. 3.1A; they are identical in size to the predicted products of the *lpf*<sub>O113</sub> gene cluster. However, the predicted *irfD* gene product is 357 amino acids in length whereas *LpfD*<sub>O113</sub> is predicted to be 265 amino acids long (Fig. 3.1A) (17).

Global analysis of the current database demonstrates that there are two main groups of fimbrial gene clusters that are related to *lpf* which encodes long polar fimbriae of *S. typhimurium* (5) (Fig. 3.1). This is exemplified by a phylogenetic tree based on Clustal analysis of predicted fimbrial gene products sharing the highest homology scores with IrfA (Fig. 3.1B). Phylograms for IrfB, IrfC, and IrfD and related gene products similarly resulted in generation of the same two distinct groupings (data not shown). The two fimbrial gene clusters that are closely related to *lpf* of *S. typhimurium* are *lpf* of *E. coli* O157:H7 strain EDL933 (*lpf<sub>EDL933</sub>*), as encoded on O-island #141 (51 , 64), and a related gene cluster identified in the rabbit-specific enteropathogenic *E. coli* (REPEC) O15:H- strain 83/39 that has been named *lpf<sub>R141</sub>* (42). The predicted products of these two gene clusters exhibit a mean global % identity (% similarity) to the corresponding proteins encoded by *lpf* of *S. typhimurium* as follows: 71.9 (85.7) [LpfA], 67.8 (80.2) [LpfB], 70.2 (83.2) [LpfC], 42.6 (60.4) [LpfD], and 50.9 (68.7) [LpfE]. In addition *lpf<sub>EDL933</sub>* and *lpf<sub>R141</sub>* are inserted at the same genomic location as *lpf* of *S. typhimurium*, flanked by *yhjW* and *yhjX* (Fig. 3.1A). We have designated these gene clusters inserted between *yhjW* and *yhjX* as Group I (Fig. 3.1).

The *irf* gene cluster and corresponding predicted proteins are more closely related to *stg* of *S. typhi*, and of O-island #154 (Z5220-Z5225) of *E. coli* O157:H7 strain EDL933, than to the Group I gene clusters. Notably the *irf*, *stg*, and O-island #154 gene clusters, which comprise Group II, each lack an equivalent of the *lpfE* gene present in all gene clusters belonging to Group I. The corresponding predicted products of *stg* and O-island 154 share a mean global % identity (% similarity) of 61.4 (72.4) [IrfA], 58.8 (74.5) [IrfB], 65.3 (81.3) [IrfC], and 36.9 (53.6) [IrfD] to the corresponding proteins of the *irf* gene cluster. By contrast, the predicted *irf* gene products demonstrate a lower global % identity (% similarity) of 35.9 (52.3) [LpfA], 33.1 (56.9) [LpfB], 37.5 (59.1) [LpfC] and 27.6 (44.1) [LpfD] to the corresponding proteins of the *lpf* operon of *S. typhimurium*. The Group II gene clusters are all inserted within the *glmS-pstS* intergenic region (Fig. 3.1A). We have named the Group II fimbrial gene cluster in strain  $\chi$ 7122 *irfABCD*, for iron-regulated fimbriae, due to the iron-responsive regulation of its promoter expression (see

below), and to avoid confusion with the several types of Group I LP fimbriae described in *E. coli* EDL933 and other *E. coli* strains (42, 64).

#### **3.2.4.2 Distribution of *irfC* among the ECOR collection, *E. coli* isolates from urinary tract infections, and avian *E. coli*.**

To investigate whether the *irf* gene cluster demonstrates a phylogenetic distribution among the ECOR collection, PCR analysis was performed using primers specific for *irfC*. Among the 72 members of the ECOR collection the presence of *irf* sequences was significantly associated with phylogenetic groups B1 and D when compared to the other groups ( $P < 0.001$ ) (Table 3.2). Among the phylogenetic groups of the ECOR collection, *irf* sequences were present in all of the strains belonging to group B1, and in 75% of the strains belonging to group D, whereas only 8% of group A strains and none of the B2 or E group strains contained the *irf* sequences.

Ninety-one extra-intestinal pathogenic (ExPEC) isolates from human disease were also investigated for the presence of *irf* sequences. The ExPEC isolates tested belonged to either phylogenetic groups A, B1, B2, or D, as determined either by MLEE or by a triplex PCR method (13, 36). Analysis demonstrated that, as with the ECOR collection, *irf* sequences were highly associated with ExPEC isolates belonging to phylogenetic groups B1 and D compared to groups A and B2 ( $P < 0.001$ ). No *irf*<sup>+</sup> isolates were identified in ExPEC isolates belonging to phylogenetic group B2 (Table 3.2). As the *irf* fimbrial gene cluster was initially identified in the APEC O78 strain  $\chi$ 7122, the presence of *irf* sequences was also investigated in APEC isolates (Table 3.3). *irf* sequences were present in 133/298 (44.6%) of APEC isolates. *irf* was significantly associated ( $P < 0.05$ ) with APEC isolates when compared with those from the feces of healthy poultry, since only 8 of 32 (25%) of environmental isolates contained *irf* sequences (Table 3.3). There was no significant association with the presence of *irf* sequences and the lethality class of APEC or environmental isolates (Table 3.3). Among the most common serogroups associated with avian disease (O1, O2, and O78), *irf* was significantly associated with APEC isolates belonging to serogroup O78 (Table 3.4). *irf* sequences were present in 90.7% of the APEC isolates belonging to serogroup O78, as compared to 14.3% of serogroup O1

isolates, and none of strains belonging to serogroup O2 (Table 3.4). Determination of the phylogenetic grouping of APEC isolates by triplex PCR demonstrated that strains from serogroups O1 and O2 belonged to phylogenetic group B2. This finding correlates with the low prevalence of *irf* sequences observed in ECOR and ExPEC strains belonging to group B2. In the case of strains belonging to serogroup O78, these isolates were classed as either group A or D by multiplex PCR. Therefore, in contrast to the ECOR reference collection, there was a greater distribution of *irf*<sup>+</sup> isolates among strains classified as phylogenetic group A among APEC isolates. This observed difference may be based on discrepancies between MLEE typing and the multiplex PCR typing method rather than actual gene content or divergence of the APEC O78 strains. It has been found that the O78 reference strain ECOR70, which is a member of group B1 by MLEE typing, is classed as group A by multiplex PCR typing (13). APEC O78 strains may therefore require more in depth analysis to correctly determine their relatedness to other *E. coli* strains. In addition, 10 isolates were tested for the localization of *irf* to the *glmS-pstS* intergenic region by PCR amplification using the *glmS*-F and *irfC*-R primers. Nine of the 10 DNA samples from these isolates gave amplification products identical to that obtained for strain  $\chi$ 7122. These results suggest that the genomic location of *irf* at the *glmS-pstS* intergenic region is conserved in most *E. coli irf*<sup>+</sup> strains.

#### **3.2.4.3 Contribution of *irf* genes to adherence of *E. coli* to UM-UC-3 and INT407 epithelial cells.**

To determine whether the *irf* genes confer adherence of *E. coli* to epithelial human bladder cells (UM-UC-3) and to intestinal epithelial cells (INT407), plasmid pIJ2 (*irfABCD*) was transformed into strain ORN103 and adherence assays were performed using ORN103(pCR-XL-TOPO) as a negative control. Strain ORN103 is an *E. coli* K-12 derivative that lacks type 1 fimbriae and does not produce any other known adhesins (48). The quantitative assays indicated that ORN103(pIJ2) adhered to both epithelial cell lines to a significantly greater extent than did the negative control strain ORN103(pCR-XL-TOPO) (Fig. 3.2). ORN103(pIJ2) was at least twice as adherent to UM-UC-3 cells (14.2% of initial bacteria recovered for ORN103(pIJ2) and 6.5% for the control strain:  $P < 0.001$ ), and at least 3 times more adherent to INT407 cells (17.2% of initial bacteria



recovered for ORN103(pIJ2) and 5.6% for the control strain:  $P < 0.001$ ), than was ORN103(pCR-XL-TOPO). These results were confirmed by light microscopy of stained cells, where ORN103 containing the *irf* genes adhered to a greater extent to both cell lines than did the strain harboring the control vector. Furthermore, ORN103(pIJ2) bacterial cells adhered in aggregates, suggesting receptor-specific binding, whereas the control strain was diffusely adherent (Fig. 3.3).

#### **3.2.4.4 Adherence to chicken tracheal and lung tissues.**

To examine the capacity of IR fimbriae to mediate adherence to avian respiratory tissues, ORN103(pIJ2) and a control strain were tested for adherence to chicken lung and tracheal sections in a qualitative assay. ORN103 cells containing *irf* demonstrated adherence in a clustered fashion to both tracheal and lung tissues, whereas the control strain adhered to a much lesser degree (Fig. 3.4). Moreover, ORN103(pIJ2) cells adhered mostly to the mucus layer and to the mucosal epithelium of the trachea. Although the adhered clusters of ORN103(pIJ2) cells were not uniformly distributed, the clustered adherence pattern was not observed for the control strain, where very few bacteria adhered to either tracheal or lung tissues.

#### **3.2.4.5 Visualisation of IR fimbriae by induced expression in strain ORN172.**

In order to induce the expression of IR fimbriae, *irf* genes were cloned into plasmid pBAD18-Cm and transformed into the fimbriae-negative strain ORN172. Strains ORN172(pBAD18-Cm) and ORN172(pIJ39) were grown overnight at 37°C on TSA plates containing 0.05% arabinose and were then analyzed by electron microscopy. Fimbriae were observed in the strain containing pIJ39 that had a diameter of about 9 nm and a maximum observed length of 1.8  $\mu\text{m}$  (Fig. 3.5). The fimbriae appeared to be distributed peritrichously on the cell surface. The proportion of bacteria expressing fimbriae was less than half and the fimbriae were often found either broken off the cells or broken to a shorter length. This made it difficult to assess the full length of these appendages. In contrast, no fimbriae were visualized on the control strain. Flagella were also visible on the surface of both ORN172(pBAD18-Cm) and ORN172(pIJ39). In the

374 absence of arabinose fimbrial structures were not observed, even in strain  
375 ORN172(pIJ39).

#### 376 3.2.4.6 Transcription of the *irf* operon is regulated by carbon source and iron.

377 In order to investigate regulation of *irf* gene expression, an operon fusion of the  
378 *irfA* promoter and a reporter *lacZ* gene was generated using the pRS415 plasmid. The  
379 resulting plasmid, pIJ32, and the control vector were inserted in the  $\Delta lacZYA$  derivatives  
380 of strains  $\chi 7122$  and  $\chi 289$ , named QT51 and QT52 respectively, in order to determine if  
381 there is a difference in expression between the wild-type APEC strain and *E. coli* K-12  
382 strain. The expression of the promoter fusion was examined in three liquid media, i.e.  
383 LB, M9 with glycerol, and M9 with glucose as a carbon source (Fig. 3.6A). Strains were  
384 grown at 37°C to mid-exponential phase. In both strains,  $\beta$ -galactosidase was expressed  
385 at a higher level in the M9 glycerol medium than in LB ( $P < 0.05$ ). Promoter expression in  
386 strain QT51 was increased 1.9-fold in M9 medium with glucose and 2.4-fold in M9  
387 medium with glycerol compared to the expression in LB medium. A similar increase was  
388 observed in strain QT52 between the expression in LB medium and the M9 media, where  
389 a 1.8-fold increase and a 3.0-fold increase was observed in M9 with glucose and M9 with  
390 glycerol, respectively. Therefore, there seems to be a higher promoter expression in M9  
391 medium containing glycerol as a carbon source.

392 In order to determine whether iron concentration or Fur, the global iron-dependent  
393 regulator of *E. coli*, has a regulatory effect on the *irf* promoter, plasmids pIJ32 and  
394 pRS415 were transformed into strain H1443 and its  $\Delta fur$  derivative H2331. As shown in  
395 Fig. 3.6B, there was a significant increase in  $\beta$ -galactosidase expression by pIJ32 in  
396 H1443 with increasing amounts of iron ( $P < 0.005$ ). Specifically, expression increased 1.2-  
397 fold from 0  $\mu M$  to 10  $\mu M$  of added iron and 3.3-fold from 10  $\mu M$  to 30  $\mu M$  of added iron.  
398 By contrast, increased iron concentrations had a less marked effect on  $\beta$ -galactosidase  
399 expression levels in the  $\Delta fur$  strain H2331 ( $P < 0.02$ ). Specifically, there was a 2.5-fold  
400 increase from 0  $\mu M$  to 10  $\mu M$  of added iron and a 1.3-fold increase from 10  $\mu M$  to 30  
401  $\mu M$  of added iron. When comparing the two strains in NB with 0  $\mu M$  of added iron,  $\beta$ -  
402 galactosidase was 2.0-fold higher in strain H1443, whereas at 10  $\mu M$  of added iron,  $\beta$ -

galactosidase expression in both strains was similar. However, at 30  $\mu$ M of added iron, the amount of promoter expression was 2.3-fold higher in H1443 than its  $\Delta fur$  derivative H2331. At all times, background levels of  $\beta$ -galactosidase activity remained low from the negative control vector pRS415. These results indicate that increased iron concentrations increased *PirfA* activity and suggest that Fur may act as a positive regulator of the *irf* promoter at higher iron concentrations.

### 3.2.5 Discussion

An important initial step for bacterial pathogens to establish an infection is adherence to and colonization of host tissues and mucosal surfaces. Pathogenic *E. coli* strains are capable of causing numerous types of intestinal and extra-intestinal diseases in humans and other animal hosts. A diversity of fimbrial adhesins that may contribute to pathogenesis have been identified among pathogenic *E. coli* (28, 41, 62). The capacity of avian pathogenic *E. coli* (APEC) to cause disease is dependent on a variety of virulence factors. APEC virulence is associated with unique chromosomal regions that are absent from *E. coli* K-12 (10, 16). Recently, several APEC-specific putative adhesin-encoding genes expressed *in vivo* within the tissues of experimentally infected chickens were identified in the APEC strain  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9) by using the nucleic acid capture method SCOTS (20). At the amino acid level, one of these *in vivo*-expressed sequences, *ecs-3*, shared homology with several fimbrial ushers.

Sequencing of the genomic region encompassing *ecs-3* identified a four-gene operon that we have termed *irf*, for iron-regulated fimbriae. The *irf* fimbrial operon is located between the *glmS-pstS* intergenic region and is most similar to other putative fimbrial operons in *E. coli* (O-island #154) and *S. typhi* (*stg*) that are also located between *glmS* and *pstS* (Group II fimbrial gene clusters, Fig. 3.1). Database and alignment analyses demonstrate that IR fimbriae are more closely related to this distinct group of fimbriae than to other related fimbriae, located in the *yhjW-yhjX* intergenic region, such as LP fimbriae of *S. typhimurium* (5) and LP fimbriae of *E. coli* (42, 64) (Group I fimbrial gene clusters, Fig. 3.1). IR fimbriae are nearly identical to a type of fimbriae called Lpf<sub>O113</sub> that were characterized in a locus of enterocyte effacement (LEE)-negative O113:H21 EHEC strain and have also been identified as Lpf<sub>R154</sub> in a rabbit

enteropathogenic *E. coli* (REPEC) O15:H- strain (17). The major difference between IR fimbriae and the two characterized LP fimbriae is that *irfD* encodes a predicted minor subunit of 357 amino acids, whereas the corresponding predicted minor subunit of the EHEC and REPEC strains, LpfD<sub>O113</sub>, is only 265 amino acids in length (17) (Fig. 3.1). In addition, a fragment with 99% identity to the *irf/lpf*<sub>O113</sub> usher sequence was identified in a shiga toxin-producing *E. coli* O91:H21 (fragment S-22) by genomic subtraction and was localized to the *glms-pstS* intergenic region described as O-island #154 in *E. coli* O157:H7 strain EDL933 (53).

The conserved location of *irf/lpf*<sub>O113</sub> genes within a number of different *E. coli* strains, and its absence from *E. coli* K-12 and pathogenic strains CFT073 and EDL933, prompted us to investigate whether this fimbrial gene cluster was phylogenetically distributed among *E. coli* strains. Screening of the ECOR collection for *irf* sequences demonstrated that *irf* is associated with phylogenetic groups B1 (100%) and D (75%), whereas it was rare in phylogenetic group A (8%) and absent from phylogenetic groups B2 and E (Table 3.2). Screening of a number of ExPEC clinical isolates similarly indicated the presence of *irfC* in most *E. coli* isolates from phylogenetic groups B1 and D, whereas it was absent from all B2 ExPEC isolates tested (Table 3.3). Further, screening of APEC isolates demonstrated that *irf* is common among isolates of serogroup O78 but rare among those from serogroups O1 and O2 (Table 3.4). These results suggest that the *irf* gene cluster is phylogenetically distributed in *E. coli*. The *irf* operon was either present in an ancestral *E. coli* strain and was subsequently lost by certain lineages, or it may possibly have been acquired horizontally by certain phylogenetic groups at a later time. In a similar way, the related *stg* and *lpf* operons may have been acquired or lost by certain clonal lineages or serovars of *Salmonella enterica* during its evolution (4, 65).

The 5.4 kb *irf* encoding genomic region may have been acquired relatively recently by horizontal gene transfer since it exhibits an overall G+C content of 43%, which is considerably lower than the *E. coli* K-12 genome average G+C content of 50.8%. Further evidence for the probable horizontal acquisition of the *irf* gene cluster is its genomic location 3' of the *glmS* gene. The 3' terminal end of the *glmS* gene and its terminator are a preferential insertion site for transposon Tn7, and this region has been

called *attTn7* (23). The *irf* encoding sequence region begins one nucleotide 3' of the *glms* stop codon resulting in a replacement of a 205 bp span in *E. coli* K-12 with the 5423 bp *irf*-encoding region. The sequences flanking the insertion site of the *irf*-encoding region in *E. coli* and the *attTn7* site are conserved in other eubacteria, archaea and eukaryotes (12, 30). Hence, it is possible that either Tn7 or related elements and/or the conserved nucleotide sequence in this region has lead to horizontal acquisition of *irf* or related fimbrial genes in *E. coli* and *S. enterica*.

Introduction of the *irf* genes into a non-fimbriated *E. coli* K-12 strain, ORN172, conferred production of fimbrial structures similar to those observed in ORN172 containing the *lpfABCC'DE* operon of *E. coli* strain EDL933 (64). IR fimbriae were approximately 9 nm in diameter and appeared to be peritrichously distributed (Fig. 3.5). The length of the fimbriae could not be assessed due to fragmentation upon preparation for electron microscopy.

IR fimbriae, as well as related fimbriae, are adhesins capable of mediating bacterial attachment to a number of cell/tissue types. IR fimbriae increased adherence of non-fimbriated *E. coli* K-12 cells to both human epithelial cell lines and avian respiratory tissues. IR fimbriae mediated increased adherence to human bladder (UM-UC-3) and intestinal (INT407) cell lines. Similarly, in non-fimbriated *E. coli* K-12 strains *lpf*<sub>O113</sub> conferred increased adherence to CHO-K1 cells (17) and *lpf* of *E. coli* EDL933 conferred increased adherence to HeLa and MDBK cells (64). Moreover, LP fimbriae of *E. coli* EDL933 demonstrated a clustered adherence pattern to cell lines. A similar clustered adherence pattern to INT407 or UM-UC-3 cells was observed for otherwise non-fimbriated *E. coli* K-12 cells expressing IR fimbriae. Bäumler *et al.* (6) demonstrated that LP fimbriae of *S. typhimurium* mediated adherence and invasion of Hep-2 cells, but were not essential for adhesion to T-84, INT407 or HeLa cell lines. Furthermore, the *lpf* operon of *S. typhimurium* was also shown to be involved in colonization of murine ileal Payer's patches (6).

Currently, the specific host receptors recognized by any of these adhesins remain unknown. IR fimbriae have only two apparent structural proteins, i.e. IrfA, the likely major structural subunit, and IrfD, a putative minor subunit. IrfD shares similarity to a number of fimbrial adhesins. Interestingly, the highly similar *Lpf*<sub>O113</sub> fimbriae described

for strains EH41 and 83/39 have a truncated D minor subunit that is 97 residues shorter than IrfD (Fig. 3.1) (17). It remains to be determined if this truncation alters the adherence specificity of these fimbriae.

A number of adhesins that mediate adherence of APEC to avian tissues or cells have been identified. These include type 1 fimbriae (16, 32), P fimbriae (52), AC/I fimbriae (2, 69), curli (11, 22), and Tsh (21, 54). Although several adherence factors were identified in APEC, none were demonstrated as essential for the initial stages of infection in chickens (21, 31, 35, 52). Other adhesins may therefore be involved in the initial stages of colonization of the chicken respiratory tract. Evidence that IR fimbriae contribute to adherence in avian respiratory tissues was obtained by performing adhesion assays on chicken tracheal and lung tissue sections using *E. coli* strain ORN103(pIJ2). The strain harboring the *irf* operon adhered to both tissue types to a much higher extent than did the control strain. That IR fimbriae mediated adherence of non-fimbriated *E. coli* K-12 to avian frozen tissue sections suggests a possible role for this adhesin in the colonization of the avian respiratory tract by certain APEC strains. In human ExPEC strains type 1 and P fimbriae have been shown to contribute to the virulence in urinary tract infection models (3, 56). Curli may also induce mediators of the inflammatory response during extra-intestinal *E. coli* infection (7, 8). Since *irf* was associated with certain ExPEC and APEC strains, and since IR fimbriae mediated adherence to both avian tissues and bladder epithelial cells, it will be of interest to investigate the contribution of IR fimbriae alone or in concert with other known adhesins to the pathogenesis of urinary tract infections and avian colisepticemia, respectively.

Several environmental factors can regulate fimbrial expression such as carbon source, aliphatic amino acids, iron, temperature, and electron acceptors other than oxygen (34). *lacZ* fusion assays using the *irfA* promoter indicate that this operon is transcribed in wild-type strains QT51 and QT52. Testing expression of the *irf* promoter in several media suggested that the carbon source affects *irf* expression, as there was increased promoter activity in M9 medium with glycerol as opposed to glucose (Fig. 3.6A). Furthermore, the induction was lower in rich medium than in the minimal salts media, which may be indicative of an increased expression of the fimbriae in nutrient poor conditions. Carbohydrate source is known to effect the expression of many bacterial

genes, including those encoding fimbriae. Glucose and rich medium may inhibit fimbrial expression by catabolite repression (34). Catabolite repression mediated regulation of genes involves global regulation by cAMP and cAMP receptor protein (CRP), which is an essential regulator of expression of P fimbriae (66). However, there do not appear to be any typical CAP binding motifs in the region of the *irf* fimbrial promoter region, suggesting it is unlikely that CAP directly regulates the expression of IR fimbriae.

Iron metabolism is typically regulated in response to iron availability, and in *E. coli* the expression of over 90 genes is regulated by the ferric uptake regulator protein (Fur) (26). The expression of the *irfA* promoter increases as the amount of iron in the medium increases. However, in the *fur* mutant strain, this increase is much less striking, suggesting that Fur plays a role in the expression of *Irf*. Fur acts mainly as a repressor of the *E. coli* iron acquisition genes under iron sufficiency, as the Fur-Fe<sup>+2</sup> complex actively binds to regulatory regions (known as Fur boxes) to inhibit transcription of these genes. However, several genes are known to be induced by iron in a Fur-dependant manner, the most studied being the superoxide dismutase encoding gene *sodB* (1). These genes, which are positively regulated by Fur, apparently do not possess a Fur box and are most likely indirectly regulated by Fur. Using transcriptional profiling, McHugh *et al* recently identified 101 genes in *E. coli* K-12 that are regulated by the Fe<sup>2+</sup>-Fur complex; these are involved in iron metabolism or energy production, or are of miscellaneous or unknown function. Forty-eight of these genes were induced by Fur (38). A possible explanation for Fur mediated positive regulation is a small RNA, RyhB, that in the presence of iron appears to act as a Fur-repressed negative regulator of these genes (37). Analysis of the *irf* promoter region does not demonstrate a region complementary to RyhB regulatory RNA. Therefore, RyhB is unlikely to be a direct regulator of the *irf* gene expression. In contrast to certain fimbrial operons such as those encoding type 1, S, and P fimbriae, IR and related LP fimbriae encoding systems do not contain any specific regulatory elements. The specific regulatory control of *irf* expression and the involvement of Fur, RyhB, and possibly other regulators remain to be elucidated.

The *ecs-3* sequence corresponding to a fragment of the *irfC* gene was initially identified as an APEC-specific gene expressed in the pericardium of infected chickens (21). In systemic tissues such as the pericardium it is likely that iron availability to the

bacterial cells is limited due to iron sequestration by host ferroproteins. This is supported by the identification of aerobactin and salmochelin siderophore-encoding genes that were also identified in the pericardial tissues of infected chickens (21). Siderophore-encoding genes are typically repressed in iron replete conditions as their transcription is reduced by the Fur-Fe<sup>+2</sup> complex. Analysis of regulatory expression of *irf* by using a *lac* operon fusion demonstrated that *irf* expression is greater under iron rich than iron poor conditions (Fig. 3.6B). Additionally, although increased iron levels induced higher expression of *irf*, the *irf* promoter was still activated in the absence of added iron. Further, addition of the iron chelator dipyrldyl to the medium did not significantly decrease *irf* promoter activity *in vitro* (unpublished results). Hence, *in vitro* *irf* is adequately expressed in low iron conditions and is induced in conditions of high iron availability. The implications of the iron regulated control of *irf* *in vitro* merit further investigation *in vivo*, specifically in relation to different anatomical sites. For instance will IR fimbriae be more highly expressed in the iron-replete environment of the intestinal tract as compared to the iron-restricted environment of systemic tissues? Further studies will be required to more fully elucidate the regulatory mechanisms controlling expression of IR fimbriae, whether IR fimbriae are selectively or preferentially produced in different host tissues or environments or their possible role in extra-intestinal infections caused by *E. coli*.

### 3.2.6 Acknowledgements

Kind thanks to K. Hantke, P. Orndorff, B. Wanner, and J. M. Fairbrother for the gift of strains or plasmids. Funding for this project was provided by Natural Sciences and Engineering Research Council Canada (NSERC) individual research grants to C. M. D. and F. D. and a summer studentship to S. L.. M. H. L. was the recipient of a Fondation Armand-Frappier Scholarship. This material is based upon work supported by Office of Research and Development, Medical Research Service, Department of Veterans Affairs, and National Research Initiative (NRI) Competitive Grants Program/ United States Department of Agriculture grant 00-35212-9408 (J.R.J.)



### 3.2.7 References

1. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev* **27**:215-37.
2. **Babai, R., G. Blum-Oehler, B. E. Stern, J. Hacker, and E. Z. Ron.** 1997. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **149**:99-105.
3. **Bahrani-Mougeot, F. K., E. L. Buckles, C. V. Lockatell, J. R. Hebel, D. E. Johnson, C. M. Tang, and M. S. Donnenberg.** 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* **45**:1079-93.
4. **Baumler, A. J., A. J. Gilde, R. M. Tsois, A. W. van der Velden, B. M. Ahmer, and F. Heffron.** 1997. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J. Bacteriol.* **179**:317-22.
5. **Baumler, A. J., and F. Heffron.** 1995. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **177**:2087-97.
6. **Baumler, A. J., R. M. Tsois, and F. Heffron.** 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* **93**:279-83.
7. **Bian, Z., A. Brauner, Y. Li, and S. Normark.** 2000. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* **181**:602-12.
8. **Bian, Z., Z. Q. Yan, G. K. Hansson, P. Thoren, and S. Normark.** 2001. Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J. Infect. Dis.* **183**:612-9.
9. **Blattner, F. R., G. Plunkett, III, 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* 277:1453-74.
10. **Brown, P. K., and R. Curtiss, III.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 93:11149-54.
  11. **Brown, P. K., C. M. Dozois, C. A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge, and R. Curtiss, III.** 2001. MlrA, a novel regulator of curli (Agf) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*. *Mol. Microbiol.* 41:349-63.
  12. **Chakrabarti, A., P. Desai, and E. Wickstrom.** 2004. Transposon Tn7 Protein TnsD binding to *Escherichia coli* attTn7 DNA and its eukaryotic orthologs. *Biochemistry* 43:2941-6.
  13. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:4555-8.
  14. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 97:6640-5.
  15. **DeBruijn, F. J., and S. Rossbach.** 1994. Transposon mutagenesis, p. 387-405. *In* P. Gerhardt (ed.), *Methods for General and Molecular Bacteriology*. ASM Press, Washington, D.C.
  16. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.* 30:299-316.
  17. **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.* 70:6761-9.
  18. **Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type

- 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. Avian Dis. **38**:231-9.
19. **Dozois, C. M., and R. Curtiss, III.** 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. Vet Res **30**:157-79.
20. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, III.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A **100**:247-52.
21. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, III.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. Infect. Immun. **68**:4145-54.
22. **Gophna, U., M. Barlev, R. Seijffers, T. A. Oelschlager, J. Hacker, and E. Z. Ron.** 2001. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. Infect. Immun. **69**:2659-65.
23. **Gringauz, E., K. A. Orle, C. S. Waddell, and N. L. Craig.** 1988. Recognition of *Escherichia coli* attTn7 by transposon Tn7: lack of specific sequence requirements at the point of Tn7 insertion. J. Bacteriol. **170**:2832-40.
24. **Guzman, L. M., D. Belin, M. J. Carson, and J. Beckwith.** 1995. Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose pBAD promoter. J. Bacteriol. **177**:4121-30.
25. **Hanahan, D., J. Jessee, and F. R. Bloom.** 1995. Techniques for transformation of *E. coli*, p. 1-35. In D. M. Glover and B. D. Hames (ed.), DNA cloning I: Core techniques. Oxford Univ. Press, New York, N.Y.
26. **Hantke, K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. Curr. Opin. Microbiol. **4**:172-7.
27. **Hantke, K.** 1987. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K-12: *fur* not only affects iron metabolism. Mol. Gen. Genet. **210**:135-9.
28. **Hultgren, S. J., C. Hal Jones, and S. Normark.** 1996. Bacterial adhesins and their assembly, p. 2730-2756. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd Ed. ed. ASM Press.

29. **Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **175**:6212-9.
30. **Koch, B., L. E. Jensen, and O. Nybroe.** 2001. A panel of Tn7-based vectors for insertion of the *gfp* marker gene or for delivery of cloned DNA into Gram-negative bacteria at a neutral chromosomal site. J. Microbiol. Methods **45**:187-95.
31. **La Ragione, R. M., W. A. Cooley, and M. J. Woodward.** 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. J. Med. Microbiol. **49**:327-38.
32. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. Res. Vet. Sci. **73**:27-35.
33. **Le Bouguenec, C., M. Archambaud, and A. Labigne.** 1992. Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. J. Clin. Microbiol. **30**:1189-93.
34. **Low, D., B. Braaten, and M. Van Der Woude.** 1996. Fimbriae, p. 146-157. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press.
35. **Marc, D., P. Arne, A. Bree, and M. Dho-Moulin.** 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a *fim*- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. Res. Microbiol. **149**:473-85.
36. **Maslow, J. N., T. S. Whittam, C. F. Gilks, R. A. Wilson, M. E. Mulligan, K. S. Adams, and R. D. Arbeit.** 1995. Clonal relationships among bloodstream isolates of *Escherichia coli*. Infect. Immun. **63**:2409-17.
37. **Masse, E., and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **99**:4620-5.
38. **McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper, and S. C. Andrews.** 2003. Global

- iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J. Biol. Chem.* **278**:29478-86.
39. **Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y.
  40. **Nag, D. K., H. V. Huang, and D. E. Berg.** 1988. Bidirectional chain-termination nucleotide sequencing: transposon Tn5seq1 as a mobile source of primer sites. *Gene* **64**:135-45.
  41. **Nataro, J. P., and J. B. Kaper.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
  42. **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**:1230-1239.
  43. **Nowicki, B., H. Holthofer, T. Saraneva, M. Rhen, V. Vaisanen-Rhen, and T. K. Korhonen.** 1986. Location of adhesion sites for P-fimbriated and for 075X-positive *Escherichia coli* in the human kidney. *Microb. Pathog.* **1**:169-80.
  44. **Ochman, H., and R. K. Selander.** 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J. Bacteriol.* **157**:690-3.
  45. **Olsen, A., A. Arnqvist, M. Hammar, and S. Normark.** 1993. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect. Agents Dis.* **2**:272-4.
  46. **Olsen, A., A. Jonsson, and S. Normark.** 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**:652-5.
  47. **Olsen, A., M. J. Wick, M. Morgelin, and L. Bjorck.** 1998. Curli, fibrous surface proteins of *Escherichia coli*, interact with major histocompatibility complex class I molecules. *Infect. Immun.* **66**:944-9.
  48. **Orndorff, P. E., and S. Falkow.** 1985. Nucleotide sequence of *pilA*, the gene encoding the structural component of type 1 pili in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **162**:454-7.

49. **Osek, J., M. Weiner, and E. L. Hartland.** 2003. Prevalence of the *lpf*(O113) gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. *Vet. Microbiol.* **96**:259-66.
50. **Parkhill, J., G. Dougan, K. D. James, N. R. Thomson, D. Pickard, J. Wain, C. Churcher, K. L. Mungall, S. D. Bentley, M. T. Holden, M. Sebaihia, S. Baker, D. Basham, K. Brooks, T. Chillingworth, P. Connerton, A. Cronin, P. Davis, R. M. Davies, L. Dowd, N. White, J. Farrar, T. Feltwell, N. Hamlin, A. Haque, T. T. Hien, S. Holroyd, K. Jagels, A. Krogh, T. S. Larsen, S. Leather, S. Moule, P. O'Gaora, C. Parry, M. Quail, K. Rutherford, M. Simmonds, J. Skelton, K. Stevens, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2001. Complete genome sequence of a multiple drug resistant *Salmonella enterica* serovar *Typhi* CT18. *Nature* **413**:848-52.
51. **Perna, N. T., G. Plunkett, III, 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. Potamouisis, 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**:529-33.
52. **Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb. Pathog.* **22**:331-41.
53. **Pradel, N., S. Leroy-Setrin, B. Joly, and V. Livrelli.** 2002. Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:2316-25.
54. **Provence, D. L., and R. Curtiss, III.** 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **62**:1369-80.

55. **Provence, D. L., and R. Curtiss, III.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect. Immun.* **60**:4460-7.
56. **Roberts, J. A., B. I. Marklund, D. Ilver, D. Haslam, M. B. Kaack, G. Baskin, M. Louis, R. Mollby, J. Winberg, and S. Normark.** 1994. The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11889-93.
57. **Romling, U., W. D. Sierralta, K. Eriksson, and S. Normark.** 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol. Microbiol.* **28**:249-64.
58. **Russo, T. A., and J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J. Infect. Dis.* **181**:1753-4.
59. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
60. **Simons, R. W., F. Houman, and N. Kleckner.** 1987. Improved single and multicopy *lac*-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* **53**:85-96.
61. **Sjoberg, U., G. Pohl, and A. Olsen.** 1994. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol. Microbiol.* **14**:443-52.
62. **Smyth, C. J., M. Marron, and S. G. J. Smith.** 1994. Fimbriae of *Escherichia coli*, p. 399-436. *In* C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB international, Wallingford.
63. **Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* **181**:1059-71.
64. **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**:5416-27.
65. **Townsend, S. M., N. E. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. J. Baumler.** 2001. *Salmonella enterica* serovar Typhi possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. Infect. Immun. **69**:2894-901.
  66. **Weyand, N. J., B. A. Braaten, M. van der Woude, J. Tucker, and D. A. Low.** 2001. The essential role of the promoter-proximal subunit of CAP in *pap* phase variation: Lrp- and helical phase-dependent activation of *papBA* transcription by CAP from -215. Mol. Microbiol. **39**:1504-22.
  67. **White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson, and T. S. Whittam.** 1993. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. Microb. Pathog. **14**:399-409.
  68. **Woodall, L. D., P. W. Russell, S. L. Harris, and P. E. Orndorff.** 1993. Rapid, synchronous, and stable induction of type 1 piliation in *Escherichia coli* by using a chromosomal *lacUV5* promoter. J. Bacteriol. **175**:2770-8.
  69. **Yerushalmi, Z., N. I. Smorodinsky, M. W. Naveh, and E. Z. Ron.** 1990. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. Infect. Immun. **58**:1129-31.
  70. **Zhang, L., B. Foxman, and C. Marrs.** 2002. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. J. Clin. Microbiol. **40**:3951-5.



### 3.2.8 Tables

**TABLE 3.1.** Bacterial strains and plasmids used in this study

| Strain or plasmid      | Characteristics <sup>a</sup>                                                                                                                     | Reference or source            |
|------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>E. coli strains</b> |                                                                                                                                                  |                                |
| DH5α                   | F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> ϕ80 Δ( <i>lacZYA-argF</i> ) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>                               | Bethesda Research Laboratories |
| H1443                  | <i>araD139 ΔlacU169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB</i>                                                                            | (27)                           |
| H2331                  | <i>araD139 ΔlacU169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR aroB Δfur</i>                                                                       | (29)                           |
| MG1655                 | F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> <i>rph-1</i>                                                                                                       | (9)                            |
| ORN103                 | <i>thr-1 leu-6 thi-1 Δ(argF-lac)U169 xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6 rspL tonA2 minA minB Δ(fimEACDFGH)</i>                                             | (48)                           |
| ORN172                 | <i>thr-1 leuB thi-1 Δ(argF-lac)U169 xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6 rspL tonA2 supE44 Δ(fimBEACDFGH)::kan pilG1</i>                                     | (68)                           |
| QT51                   | Strain χ7122 Δ <i>lacZYA</i>                                                                                                                     | This study                     |
| QT52                   | Strain χ289 Δ <i>lacZYA</i>                                                                                                                      | This study                     |
| TOP10                  | F <sup>-</sup> <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i> | Invitrogen                     |
| χ289                   | W1485 F <sup>-</sup> , λ- <i>glnV44</i>                                                                                                          | (10)                           |
| χ7122                  | Wild-type APEC O78:K80:H9, <i>gyrA</i> NaI <sup>R</sup>                                                                                          | (55)                           |
| <b>Plasmids</b>        |                                                                                                                                                  |                                |
| pBAD18-Cm              | Arabinose inducible vector, Cm <sup>R</sup>                                                                                                      | (24)                           |
| pCP20                  | FLP helper plasmid, temperature-sensitive                                                                                                        | (14)                           |

|             |                                                                                                                          |            |
|-------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
|             | replication, Cm <sup>R</sup> and Ap <sup>R</sup>                                                                         |            |
| pCR-XL-TOPO | High-copy cloning vector, Km <sup>R</sup>                                                                                | Invitrogen |
| pIJ2        | 5.8 kb PCR fragment of <i>irfABCD</i> cloned into pCR-XL-TOPO; Km <sup>R</sup>                                           | This study |
| pIJ14       | <i>Xba</i> I and <i>Hind</i> III fragment of pIJ2 containing the <i>irf</i> operon cloned into pACYC184, Cm <sup>R</sup> | This study |
| pIJ32       | PCR fragment containing the <i>irfA</i> promoter cloned into pRS415, Ap <sup>R</sup>                                     | This study |
| pIJ39       | PCR fragment of <i>irfABCD</i> cloned into pBAD18-Cm, Cm <sup>R</sup>                                                    | This study |
| pKD3        | FRT- <i>cat</i> cassette Template plasmid, Cm <sup>R</sup> , Ap <sup>R</sup>                                             | (14)       |
| pKD46       | Red recombinase expression plasmid, Ap <sup>R</sup>                                                                      | (14)       |
| pRS415      | Operon fusion vector, Ap <sup>R</sup>                                                                                    | (60)       |

<sup>a</sup> Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Nal, naladixic acid.

**TABLE 3.2.** Phylogenetic distribution of *irfC* among the ECOR collection and ExPEC isolates.

| Phylogenetic group | <i>E. coli</i> strains |                                                     |                    |                                                     |
|--------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|--------------------|-----------------------------------------------------|
|                    | ECOR collection        |                                                     | ExPEC isolates     |                                                     |
|                    | Total no. isolates     | No. <i>irfC</i> -positive isolates <sup>a</sup> (%) | Total no. isolates | No. <i>irfC</i> -positive isolates <sup>a</sup> (%) |
| A                  | 25                     | 2 (8)                                               | 15                 | 7 (46.7)                                            |
| B1                 | 16                     | 16 (100)                                            | 11                 | 8 (72.7)                                            |
| B2                 | 15                     | 0 (0)                                               | 24                 | 0 (0)                                               |
| D                  | 12                     | 9 (75)                                              | 41                 | 37 (90.2)                                           |
| E                  | 4                      | 0 (0)                                               | NA                 | NA                                                  |
| Total              | 72                     | 27 (37.5)                                           | 91                 | 52 (57.1)                                           |

<sup>a</sup> Positive PCR amplification using *irfC*-specific primers; For both the ECOR collection and ExPEC isolates *irf* sequences were significantly associated with phylogenetic groups B1 and D as compared to groups A and B2 (P<0.001).

**TABLE 3.3.** Distribution of *irfC* within the lethality classes of avian pathogenic *E. coli* (APEC) and environmental isolates.

| Lethality class | <i>E. coli</i> isolates |                                                     |                        |                                                     |
|-----------------|-------------------------|-----------------------------------------------------|------------------------|-----------------------------------------------------|
|                 | APEC                    |                                                     | Environmental isolates |                                                     |
|                 | Total no. isolates      | No. <i>irfC</i> -positive isolates <sup>a</sup> (%) | Total no. isolates     | No. <i>irfC</i> -positive isolates <sup>a</sup> (%) |
| LC1             | 222                     | 101 (45.5)                                          | 1                      | 1 (100)                                             |
| LC2             | 38                      | 18 (47.4)                                           | 12                     | 3 (25)                                              |
| LC3             | 38                      | 14 (36.8)                                           | 19                     | 4 (21.1)                                            |
| Total           | 298                     | 133 (44.6) <sup>b</sup>                             | 32                     | 8 (25)                                              |

<sup>a</sup> Positive PCR amplification using *irfC*-specific primers

<sup>b</sup> *irf* sequences were significantly associated with APEC isolates as compared to environmental isolates (P<0.05).

**TABLE 3.4.** Association between the O serogroups of avian pathogenic *E. coli* strains (APEC) and the presence of *irfC*.

| O antigen          | No. <i>irfC</i> positive <sup>a</sup> (%) | No. strains tested |
|--------------------|-------------------------------------------|--------------------|
| O1                 | 4 (14.3)                                  | 28                 |
| O2                 | 0 (0)                                     | 46                 |
| O78                | 78 (90.7) <sup>c</sup>                    | 86                 |
| Other <sup>b</sup> | 12 (44.4) <sup>c</sup>                    | 27                 |

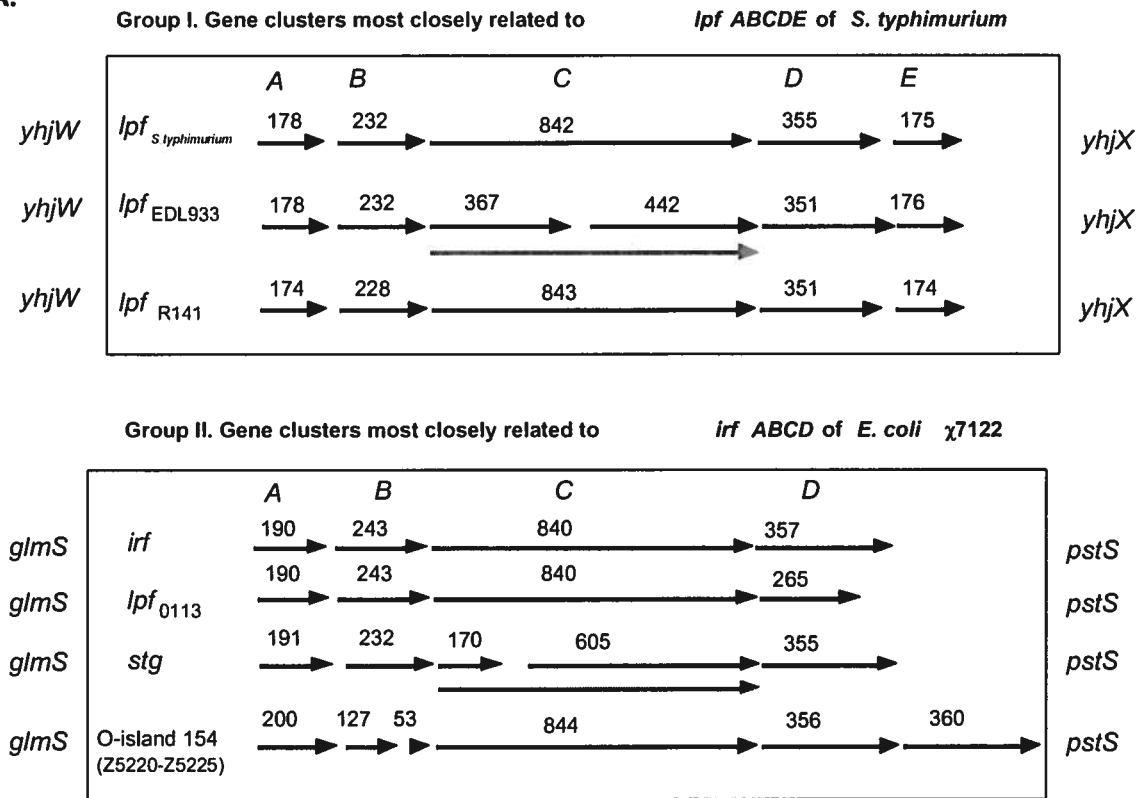
<sup>a</sup> Positive PCR amplification using *irfC*-specific primers

<sup>b</sup> Other serogroups included in this grouping are: O6, O8, O11, O15, O18, O21, O22, O35, O45, O54, O55, O71, O83, O115 and O131.

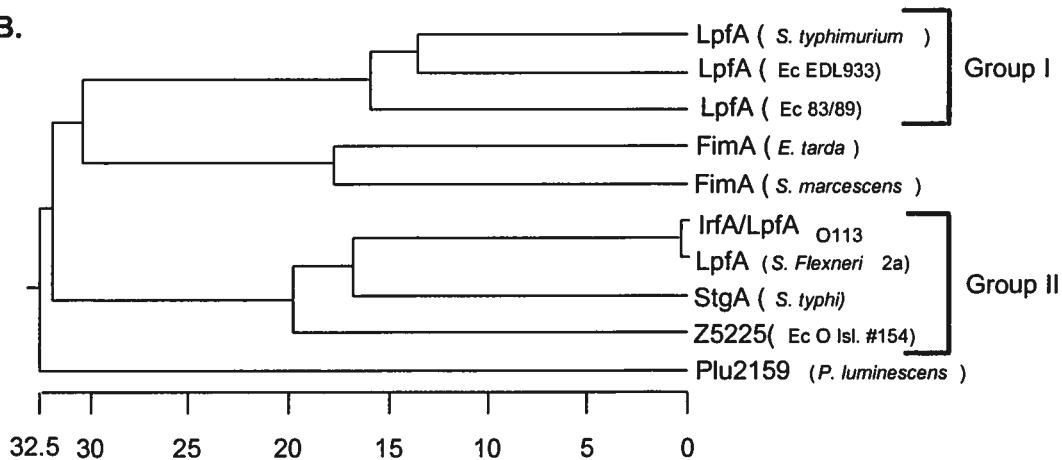
<sup>c</sup> *irf* sequences were significantly associated with strains belonging to serogroup O78 or "Other serogroups" compared to strains from serogroups O1 and O2 (P<0.001).

### 3.2.9 Figures

A.

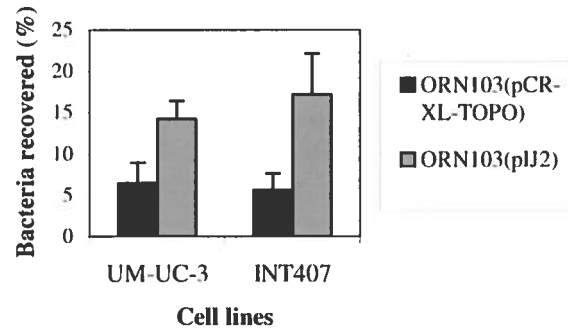


B.



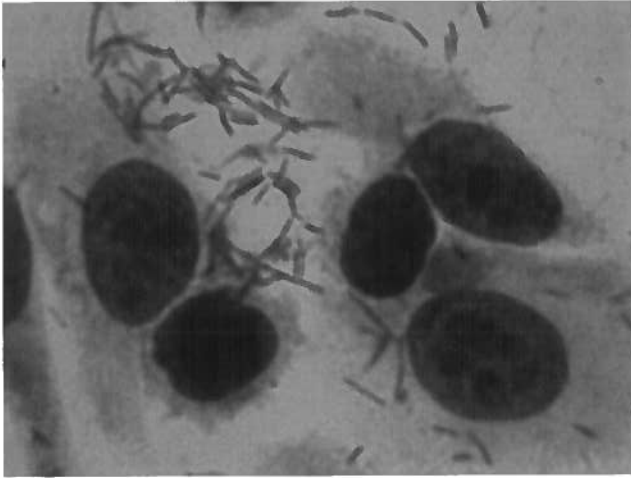
**FIG. 3.1. (A)** Genetic organization of fimbrial gene clusters closely related to *lpf* of *S. enterica* serovar Typhimurium (*S. typhimurium*) (Group I) and *irf* of APEC strain  $\chi$ 7122 (Group II). Genes adjacent to the boxes are conserved genes located next to the fimbrial

gene clusters. The predicted lengths of the ORF products in amino acids are indicated above each gene. The *lpfC* (EDL933) and *stgC* genes contain stop codons resulting in 2 smaller putative ORFs. Hypothetical full-length ORFs are indicated for these genes with light grey arrows. The last gene of O-island #154 is a second copy of a *D* allele. **(B)** Phylogram based on CLUSTAL analysis of proteins sharing highest identity/similarity with the predicted *irfA* gene product. Fimbrial gene clusters belonging to Group I, inserted in the *yhjW-yhjX* region, cluster together, whereas fimbrial gene clusters belonging to Group II, inserted in the *glmS-pstS* region, comprised a distinct cluster. Entries from top to bottom correspond to Genbank accession numbers: P43660, C86029, AAO22843, P22595, AAO52822, AAL18161, AAN45247, CAD03135, and CAE14452. Scale indicates percent difference in similarity.

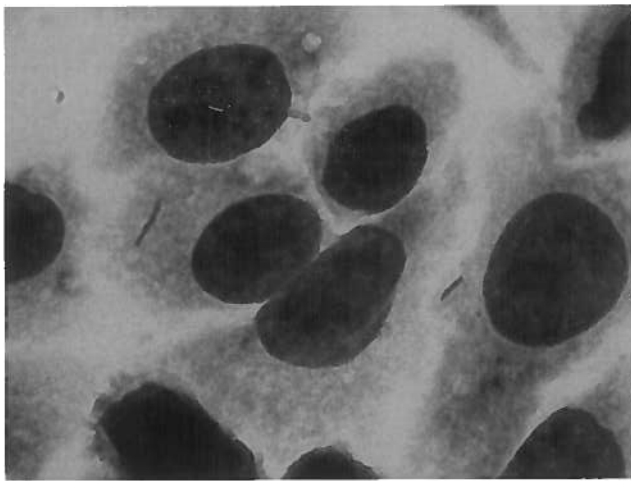


**FIG. 3.2.** Bacterial adherence assays using UM-UC-3 and INT407 epithelial cells. The percentage of the initial bacterial inoculum associated with epithelial cells after 90 min of incubation is indicated. Bacteria containing *irf* genes (pIJ2) were significantly more adherent ( $P < 0.001$ ) to both cell lines than the negative control strain ORN103(pCR-XL-TOPO). Error bars = SD.

A



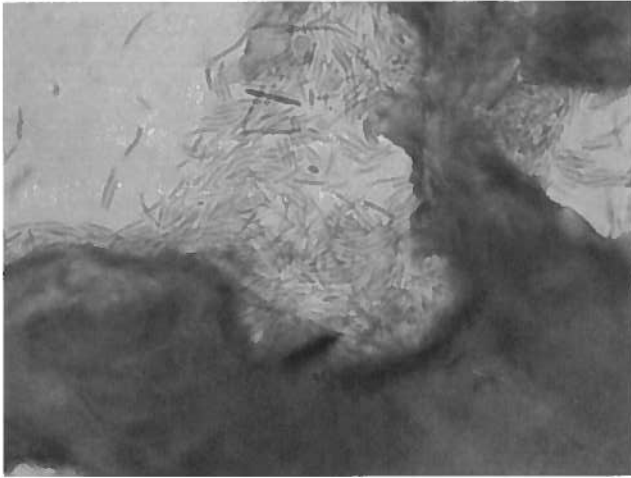
B



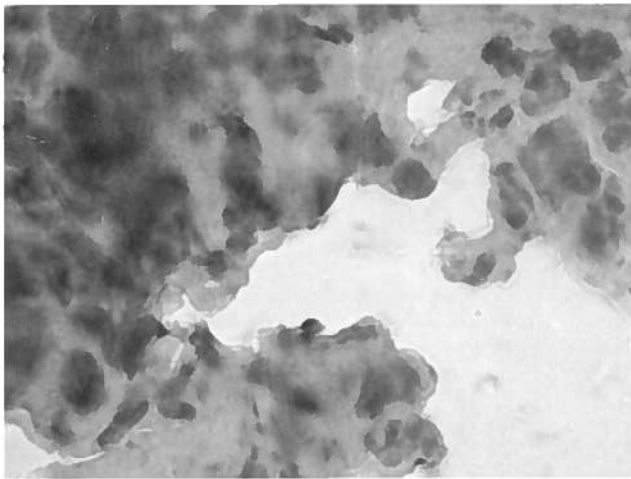
**FIG. 3.3.** Adherence assays of *E. coli* ORN103(pIJ2) (A) and ORN103(pCR-XL-TOPO) (B) to INT407 cells. Bacteria were incubated for 90 min with the cells and staining was performed with Diff-Quick®. Similar results were observed using cell line UM-UC-3 (data not shown).



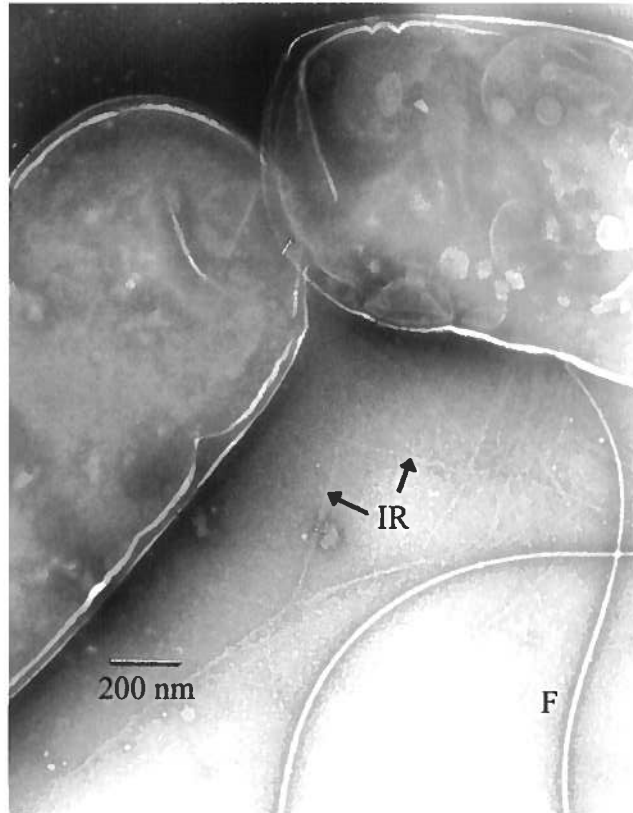
**A**



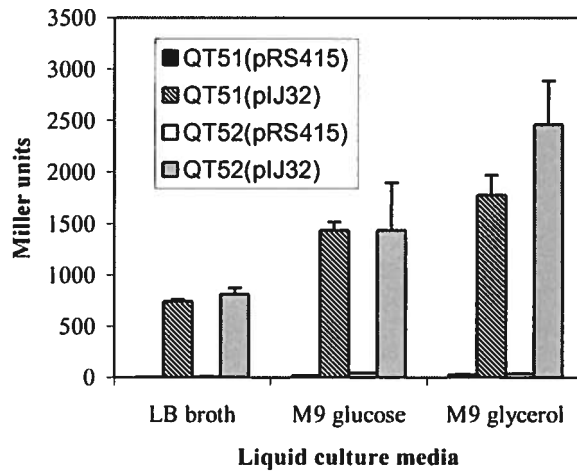
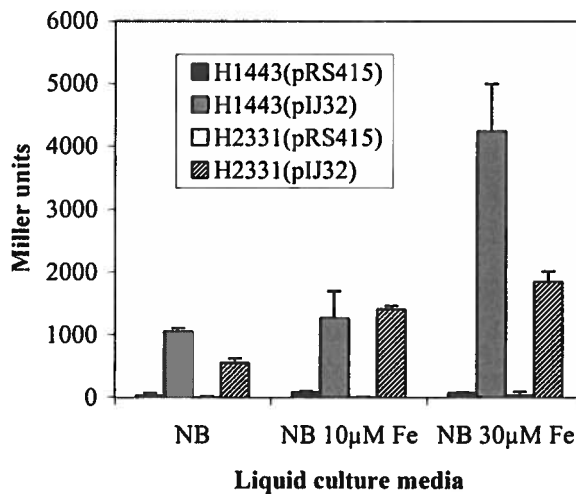
**B**



**FIG. 3.4.** Adherence of ORN103(pIJ2) (**A**) and ORN103(pCR-XL-TOPO) (**B**) to chicken lung sections. Bacteria were grown on TSA and 50  $\mu\text{L}$  of a  $5 \times 10^9$  bacterial suspension were added to the tissue sections. Slides were stained using the Diff-Quick<sup>®</sup> stain set.



**FIG. 3.5.** Expression of IR fimbriae on the surface of ORN172(pIJ39) as visualized by transmission electron microscopy. IR fimbriae have a diameter of 9 nm. Bacteria were grown overnight on TSA containing 0.05% arabinose and 10  $\mu\text{g/mL}$  chloramphenicol at 37°C. IR fimbriae were not visible on the control strain ORN172(pBAD18-Cm) and flagella were observed on both ORN172(pIJ39) and the control strain. IR: IR fimbriae; F: flagellum.

**A****B**

**FIG. 3.6. (A)**  $\beta$ -galactosidase production by *E. coli* strains QT51 and QT52 containing either pIJ32(*irfAp::lacZYA*) or pRS415 (control vector) in different liquid media during growth at 37°C to the exponential growth phase. **(B)**  $\beta$ -galactosidase production by *E. coli* strains H1443 and its  $\Delta fur$  derivative H2331 containing either pIJ32(*irfAp::lacZYA*) or pRS415 (control vector) in NB broth with increasing concentrations of added of iron. Error bars = SD.

### 3.3. Accusé de réception

From: [dsmith@asmusa.org](mailto:dsmith@asmusa.org)  
To: [charles.dozois@inrs-iaf.quebec.ca](mailto:charles.dozois@inrs-iaf.quebec.ca)  
Sent: 4/19/2004 5:13 PM  
Subject: Manuscript submission (IAI00612-04 Version 1)

Dear Dr. Dozois:

Re: Characterization of an iron-regulated (IR) fimbrial adhesin, and distribution among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains (IAI00612-04 Version 1)

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is IAI00612-04 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is dozois. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: <http://www.asm.org/journals/editors.asp>

In submitting your manuscript to Infection and Immunity (IAI), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for publication.

If your manuscript is accepted for publication in a 2004 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$53 per page for the first six pages and \$71 for each page in excess of six for a corresponding author who is an ASM member or \$61 per page for the first six pages and \$82 for each page in excess of six for a nonmember corresponding author. To obtain the member rate, a member corresponding author must include his 2004 member number on the reprint/page charge form that will be included with the proofs. To obtain the member rate, a nonmember corresponding author should complete the ASM membership application available online at <http://www.asm.org/MemberShip> and submit it and payment of the membership fee to ASM. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals, at the following address: Journals Department American Society for Microbiology 1752 N St., NW Washington, DC 20036. The fax number is 202-942-9355. The request must indicate how the work was financed and must be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper. Minireviews and Guest Commentaries are not subject to page charges.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Diane Smith  
Production Editor  
Infection and Immunity (IAI)

## Chapitre 4

### Discussion

La dualité qui se retrouve parmi les souches d'*Escherichia coli*, c'est-à-dire l'existence de souches commensales et d'autres qui sont pathogènes chez différents animaux, est un aspect intéressant pour l'étude de facteurs de virulence. Les souches pathogènes possèdent souvent des gènes ou des îlots de pathogénicité qui leur permettent de s'adapter à différents environnements et leur confèrent un avantage dans différents stades de l'infection chez l'hôte. Un groupement de ces souches pathogènes sont les *Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) qui sont responsables d'une variété de maladies extra-intestinales chez la volaille. Certains facteurs de virulence des APEC ont été identifiés à ce jour, tel que des adhésines, la capacité de résister au sérum, l'antigène K et des systèmes de séquestration de fer, mais la majorité des facteurs impliqués dans le déroulement de la maladie restent à être élucidés.

Afin d'identifier de nouveaux facteurs de virulence, Brown et Curtiss (23) ont effectué une soustraction génomique entre la souche APEC  $\chi$ 7122 et une souche de *E. coli* K-12 non-pathogène  $\chi$ 289. Ils ont identifié 12 régions génomiques uniques chez la souche APEC, dont 5 ont déjà été identifiées comme étant des séquences uniques chez des souches de *E. coli*. Afin d'identifier des séquences uniques à la souche  $\chi$ 7122, par rapport à la souche  $\chi$ 289, qui sont exprimées *in vivo* lors de l'infection chez le poulet, Dozois *et al.* (36) ont effectué la méthode de SCOTS (« selective capture of transcribed sequences »). Parmi les séquences identifiées dans cette étude, six ont été choisies (Tableau 2.2) pour vérifier si on pouvait associer leur présence chez des souches de *E. coli* virulentes plutôt que chez des souches non-pathogènes. La technique du PCR multiplex a permis de vérifier rapidement la présence de ces séquences chez plusieurs souches de *E. coli* dans les groupes suivants : collection ECOR, souches APEC, souches ExPEC provenant de maladies chez les humains et des souches provenant de l'environnement d'oiseaux sains (Tableau 2.1). Puisqu'aucune des séquences n'étaient plus représentées chez les souches pathogènes que chez les souches non-pathogènes (Tableau 2.3), la séquence homologue à plusieurs types de « ushers » fimbriaires

(fragment *ecs-3*), et que nous avons retrouvé dans différents types de souches, a été choisie pour des études plus approfondies.

La colonisation de différents tissus de l'hôte par une bactérie est médiée par des adhésines retrouvées à la surface de celle-ci. Chez la souche APEC  $\chi 7122$ , qui cause la septicémie chez le poulet, quelques adhésines ont été identifiées, mais aucune semble jouer un rôle critique lors de l'infection. Les adhésines identifiées chez cette souche sont les fimbriae de type 1, curli et Tsh. On pense que les adhésines sont importantes à différents endroits lors de l'infection et qu'il pourrait en avoir plus d'une qui est impliquée dans l'adhésion à un tissu. Puisque *E. coli* infecte les poulets lorsqu'ils inspirent de la poussière contaminée, la colonisation des tissus respiratoires supérieurs semble être l'étape primaire afin d'établir une infection. Un triple mutant chez la souche  $\chi 7122$  pour les gènes des fimbriae de type 1, Tsh et curli, n'a pas démontré une diminution significative dans la colonisation de la trachée, des sacs aériens et des poumons, lorsque comparé à la souche sauvage (C. Dozois, résultats non-publiés). D'autres facteurs doivent donc être impliqués dans la colonisation des voies respiratoires chez le poulet.

Le séquençage de la région entourant le fragment *ecs-3* chez la souche  $\chi 7122$  a révélé un opéron fimbriaire putatif, que nous avons nommé Irf pour « iron-regulated fimbriae », localisé entre les gènes *glmS* et *pstS* (Fig. 3.1A). Ce groupe de gènes est composé de quatre cadres de lecture ouverts : *irfA*, *irfB*, *irfC* et *irfD*. Par homologie, *irfA* pourrait être la sous-unité majeure, *irfB* le chaperon, *irfC* le usher et *irfD* la sous-unité mineure du fimbriae. Irf est homologue aux fimbriae LP (« long polar fimbriae ») de *S. typhimurium* (7) et de *E. coli* O157:H7 (159). Par contre, *irf* est localisé à environ 84 min sur le génome de *E. coli* tandis que les gènes *lpf* de ces deux bactéries se retrouvent à environ 78 min, entre les gènes *yhjW* et *yhjX*. La séquence *lpf*<sub>O113</sub>, identifiée chez une souche de *E. coli* O113:H21 (33), est 99% homologue à *irf*, et se retrouve au même endroit sur le chromosome. La séquence des gènes *lpf*<sub>R154</sub>, retrouvés chez la souche 83/39 EPEC de lapin O15:H- (REPEC pour « rabbit-specific EPEC »), est identique aux gènes *lpf*<sub>O113</sub> et se retrouvent aussi entre *glmS* et *pstS* (110). De plus, un fragment ayant 99% d'identité avec le fragment *ecs-3* a été identifié par soustraction génomique (fragment S-22) chez une souche productrice de toxine Shiga *E. coli* O91:H21 (137). La délétion de

*lpfA* chez la souche EHEC O113:H21 a eu comme résultat la réduction de l'adhérence à des cellules épithéliales d'ovaire de hamster (CHO-K1) (33). Par contre, les propriétés d'adhésion pourraient différer entre *Lpf*<sub>O113</sub> et *Lpf*<sub>R154</sub>, et les fimbriae IR car les adhésines putatives *LpfD*<sub>O113</sub> et *LpfD*<sub>R154</sub> sont composées de 265 aa tandis que *IrfD* a une longueur de 352 aa.

*irf* démontre des homologies élevées à l'îlot-154 de *E. coli* O157:H7, à *lpf*<sub>O113</sub> et *lpf*<sub>R154</sub>, ainsi qu'à *stg* de *S. typhi* (Groupe II, fig. 3.1). Tous les gènes codant pour les fimbriae faisant partie du Groupe II se retrouvent entre *glmS* et *pstS* et n'ont pas de cinquième gène correspondant à *lpfE*, comme on retrouve chez les opérons *lpf* du Groupe I. Ensuite, les fimbriae du Groupe I, c'est-à-dire *lpf* de *S. typhimurium* et *lpf* de *E. coli* O157:H7 à l'îlot 141 ainsi que *lpf*<sub>R141</sub>, sont phylogénétiquement reliés et se retrouvent tous entre *yhjW* et *yhjX*. De plus, les fimbriae dans un même groupe phylogénétique ont une plus grande homologie de séquence entre eux qu'avec ceux de l'autre groupe.

Dans une étude récente sur la prévalence de *lpfA*<sub>O113</sub> chez des souches de *E. coli* de sérogroupes O157 et O26, Osek *et al.* (128) ont démontré que ce gène est associé à des STEC LEE-négatifs et à des isolats porcins de *E. coli* O157. Suite à nos travaux, une distribution phylogénétique de *irf* a pu être identifiée grâce à la collection ECOR et les souches ExPEC (Tableau 3.2). Parmi la collection ECOR, 100% des souches du groupe B1 et 75% des souches du groupe D possèdent les séquences *irf*. Cependant, aucune des souches des groupes B2 ou E contiennent ces séquences et seulement 8% des souches du groupe A les possèdent. L'association significative de *irf* avec les groupes phylogénétiques B1 et D a aussi été démontrée chez des souches ExPEC où 72.7% et 90.2% étaient positifs pour *irf* respectivement. Encore, aucune des souches du groupe B2 des ExPEC possèdent ces séquences. Les séquences *irf* auraient donc pu être acquises par un ancêtre commun aux différentes souches de *E. coli* et ensuite être perdues lors de l'évolution de certains groupes phylogénétiques, comme le groupe B2, ou bien lors de branchements subséquents dans un même groupe, comme dans le cas de certaines souches du groupe A. Une autre possibilité serait que l'acquisition horizontale de ces gènes s'est faite par un ancêtre commun aux branchements qui possèdent ces séquences, comme par exemple le groupe phylogénétique B1. De la même façon, les opérons *stg* et *lpf* de *Salmonella enterica* ont été acquis ou perdus par certains clones ou sérovars lors de

leur évolution (6, 161). Le contenu en GC d'un gène peut être indicateur de son acquisition horizontale puisque généralement, la composition de bases du génome d'une bactérie est relativement uniforme (119). Les gènes *irf* ont une composition en GC de 43.6% et le contenu du chromosome de *E. coli* K-12 est de 50.8% (17). La composition de bases est similaire entre espèces phylogénétiquement rapprochées, comme par exemple les chromosomes de *E. coli*, *Shigella flexneri*, *S. typhimurium* et *Klebsiella pneumoniae*, qui ont des compositions en GC de 51, 51, 52 et 55 pourcent respectivement (119). Les gènes *irf* ont donc pu être acquis d'une espèce assez éloignée de *E. coli*. L'insertion du transposon Tn7 dans le chromosome de plusieurs bactéries Gram-négatives, incluant *E. coli*, se fait de façon spécifique au site *attTn7* dans le chromosome (27, 86). La présence de ce site dans la région intergénique neutre en aval du gène *glmS*, suggère un rôle possible de ce transposon dans l'insertion de diverses séquences à cet endroit dans le génome. De ce fait, parmi des souches contenant les séquences *irf*, 9 des 10 souches testées par PCR avec les amorces *glmS*-F et *irfC*-R possédaient *irf* dans la région en aval du gène *glmS*. Il est possible que les amorces *irfC*-F et *irfC*-R ne permettent pas de détecter la présence de gènes dans certaines souches s'il y a une déletion ou une mutation dans le gène. Le fait d'utiliser des amorces spécifiques à une région du « usher », qui sont les régions les plus conservées dans les gènes fimbriaires, palie partiellement à ce problème.

La façon dont les gènes *irf* ont été acquis n'est pas connue mais leur détection, avec la combinaison d'autres séquences, peut s'avérer un outil utile pour classer une souche par la méthode rapide du PCR. Cette méthode a déjà été proposée par Clermont *et al.* (26) par la détection de deux gènes (*chuA* et *yjaA*) et d'un fragment d'ADN anonyme. Bien que cette méthode ait été efficace pour classer la majorité (99%) des souches de *E. coli* testées, deux souches classées dans le groupe B1 par la méthode de MLEE ont été identifiées par la méthode de Clermont *et al.* comme étant du groupe A. Une de celles-ci est la souche ECOR70, qui est de sérotype O78:H-. Puisque O78 est un des sérotypes prédominants des souches APEC, il serait prudent d'utiliser les méthodes traditionnelles de MLEE ou de ribotypage pour classer ces souches ou bien de chercher d'autres séquences, incluant possiblement *irf*, pour remédier à la lacune de la technique.



Il y a une association significative de *irf* avec des souches APEC plutôt qu'avec des isolats provenant des fèces de poulets sains ( $P < 0.05$ ). Les gènes *irf* étaient retrouvés chez 44.6% des 298 souches APEC testées et seulement dans 25% des 32 isolats environnementaux. Ces résultats suggèrent que Irf pourrait conférer un avantage aux souches APEC lors de l'infection chez la volaille. Parmi les sérogroupes communément associés à la maladie chez la volaille (O1, O2 et O78) *irf* a été associé au séro groupe O78 de APEC où 90.7% des 86 souches O78 contenaient *irf*. Seulement 14.3% des souches APEC O1 et aucune des souches O2 ne contenaient ces séquences. Puisque les sérogroupes O1 et O2 appartiennent généralement au groupe B2, ces données corréleront avec les résultats obtenus avec la collection ECOR et les souches ExPEC. De plus, deux des trois souches du groupe D dans la collection ECOR qui ne possédaient pas *irf* sont de sérotype O2. Les souches O78 ont été classées dans les groupes A ou D par PCR multiplex (données non-inclues), mais puisque la méthode de Clermont *et al.* (26) semble mal classer ce séro groupe, il est possible qu'ils appartiennent plutôt au groupe B1. Le groupe de gènes *irf* semble donc être un facteur intéressant à inclure en tant que marqueur phylogénétique ou comme outil diagnostique en milieu clinique. Il est possible que certaines souches de *E. coli* possèdent des variantes de la séquence *irfC*, avec des changements nucléotidiques, qui ne permettent pas l'amplification avec les amorces utilisées dans cette étude. On palie partiellement ce problème en utilisant des amorces spécifiques pour la région du gène qui code pour un « usher », puisqu'il s'agit de séquences conservées parmi différents fimbriae du même type. Il serait intéressant de vérifier la présence des séquences *irf* avec des amorces spécifiques à d'autres régions de la séquence du « usher » ou en faisant des transferts de Southern.

Puisque 57% des isolats extra-intestinaux et 47% des isolats intestinaux (données non-inclues) possédaient les séquences *irf*, nous avons fait des essais d'adhérence sur les lignées épithéliales humaines de la vessie (UM-UC-3) et de l'intestin (INT407). Nos études démontrent que Irf augmente la capacité d'une souche sans fimbriae (ORN103) d'adhérer à ces lignées cellulaires. L'adhérence de ORN103(pIJ2) à ces cellules était supérieure de façon significative ( $P < 0.001$ ) par rapport à la souche contrôle, avec une plus grande augmentation d'adhérence observée avec la lignée INT407. Irf pourrait donc jouer un rôle dans l'adhésion des souches aux tissus du tractus urinaire ou à l'intestin lors

d'une infection. Les propriétés d'adhésion pourraient par contre différer entre Irf et les fimbriae LP du Groupe I. *lpf* de *S. typhimurium* semble nécessaire pour l'adhésion à la lignée cellulaire Hep-2 mais pas à INT407, T-84 ou HeLa (9). De plus, ce dernier semble être impliqué dans la colonisation des plaques de Payer murins (10). La spécificité d'adhérence pourrait aussi différer entre *irf* et les fimbriae homologues du Groupe II. La séquence codant pour les adhésines putatives LpfD<sub>O113</sub> et LpfD<sub>R154</sub> étant plus courte que celle de IrfD pourrait mener à une différence sur la spécificité d'adhésion de ces fimbriae. Torres *et al.* (159) ont démontré que Lpf de *E. coli* O157:H7 participe à la formation de microcolonies sur des cellules HeLa et MDBK. Ce patron d'adhérence en agrégats a aussi été observé sur les cellules UM-UC-3 et INT407 avec ORN103(pIJ2) suggérant un rôle potentiel de Irf dans l'interaction entre bactéries. Les récepteurs spécifiques de l'hôte auxquels adhèrent les différents fimbriae LP ainsi que les fimbriae IR restent à être élucidés. Ces études pourraient nous aider à différencier ces derniers à l'aide de propriétés moléculaires en plus des comparaisons de séquences faites dans ce mémoire.

Nous avons investigué la contribution de Irf à l'adhérence de la souche ORN103 à des tissus de la trachée et du poumon de poulets. Les bactéries contenant les gènes *irf*, ORN103(pIJ2), adhéraient en plus grand nombre aux deux types de tissus que celles qui ne possédaient pas ces gènes. De plus, les bactéries possédant *irf* adhéraient sur les tissus de façon agrégative. Ces résultats suggèrent que les fimbriae IR pourraient être importants pour la colonisation des voies respiratoires aviaires et qu'ils pourraient contribuer à l'interaction entre les bactéries afin de former les agrégats observés. Même si certains facteurs d'adhérence ont été identifiés chez APEC, incluant les fimbriae de type 1, les fimbriae P, curli, Tsh et les fimbriae AC/I, aucun semble être essentiel aux stades initiaux d'infection chez les poulets (37, 82, 95, 136). Puisque les fimbriae IR contribuent à l'adhérence aux tissus aviaires et aux cellules épithéliales humaines du tractus urinaire et sont en plus associés avec certaines souches APEC et ExPEC, il serait intéressant de vérifier la contribution de Irf à la pathogenèse des UTI et de la colisepticémie aviaire. De plus, puisque les facteurs de virulence semblent agir en synergie plutôt qu'individuellement (11, 164), on pourrait aussi vérifier l'effet de Irf, en concert avec d'autres adhésines, sur la virulence de souches pathogènes.

Les fimbriae IR ont été visualisés par microscopie électronique et ont un diamètre d'environ 9 nm. Ces structures semblent être fragiles puisqu'elles étaient brisées, ce qui rendait le calcul de leur longueur difficile à déterminer. Le fimbriae le plus long observé était de 1.8  $\mu$ m. Il est possible que la cellule ne pouvait pas supporter la quantité d'expression de *irf* induite par le promoteur pBAD et donc perdait ces structures. Une autre possibilité serait que les fimbriae se seraient brisés lors des manipulations pour la microscopie. La longueur des fimbriae LP de *S. typhimurium*, exprimés dans la souche de *E. coli* ORN172, étaient de 2 à 10  $\mu$ m et ils avaient un diamètre de 7 à 8 nm (7). Bien que ces derniers étaient distribués de façon polaire autour de la cellule, les fimbriae LP de *E. coli* O157:H7, aussi exprimés dans la souche ORN172, semblaient être distribués de façon pérित्रique (159). Ces résultats supportent notre idée que le fimbriae IR est différent des fimbriae LP décrits chez *S. typhimurium* et *E. coli* O157:H7. La structure moléculaire pourrait différer entre ces familles de fimbriae et elle reste à être élucidée.

Plusieurs facteurs environnementaux ont un effet sur la régulation de l'expression des fimbriae. Par exemple, la source de carbone, le fer et la température (90, 109). Des essais de fusion *lacZ* indiquent que le promoteur *irfA* est transcrit dans les souches sauvages QT51 et QT52, les dérivés  $\Delta$ *lacZYA* des souches  $\chi$ 7122 et  $\chi$ 289 respectivement. Lors de ces essais, les souches testées dans les mêmes conditions poussent de la même façon et la croissance bactérienne a été mesurée. La source de carbone semble affecter l'expression du promoteur *irfA*. L'expression était supérieure dans le milieu M9 avec glycérol plutôt que dans le même milieu contenant du glucose. Ensuite, l'induction était inférieure dans le milieu riche (LB) comparativement aux milieux minimaux de sel (M9) ce qui pourrait indiquer que *irf* est plutôt exprimé dans des conditions pauvres en nutriments. La source de carbone a un effet sur l'expression de plusieurs gènes bactériens. L'expression des fimbriae est inhibée par le glucose et un milieu riche, par la voie de la répression catabolique (90). La régulation globale par cAMP et la « cAMP receptor protéin » (CRP), aussi nommée « catabolite gene activator protein » (CAP), est responsable de la répression catabolique, où le glucose réduit la formation de cAMP qui est nécessaire pour l'activité de liaison à l'ADN de CRP. CAP est un régulateur essentiel à l'expression des fimbriae P puisqu'il se lie à la région du promoteur *papBA* et active la transcription. Puisqu'aucun motif de liaison de CAP se retrouve dans la région du

promoteur de *irf*, il est improbable que CAP régule directement l'expression des fimbriae IR.

Typiquement, la disponibilité du fer dans le milieu régule le métabolisme du fer par la cellule. Puisque plus de 90 gènes de *E. coli* sont régulés par le régulateur global Fur (« ferric uptake regulator ») (57), nous avons voulu vérifier l'effet de Fur sur la régulation de l'expression du promoteur de *irfA*. L'expression du promoteur *irfA* augmente avec la croissance de la quantité de fer dans le milieu. Toutefois, dans le cas de la souche  $\Delta fur$ , cette augmentation est moindre. Ceci suggère que Fur joue un rôle dans l'expression de Irf. Généralement, Fur agit comme répresseur sur les gènes d'acquisition de fer de *E. coli* lorsque le fer est suffisant. Néanmoins, plusieurs gènes sont induits par le fer de façon Fur-dépendante, le plus étudié étant le gène de la superoxide dismutase *sodB* (3). Ces derniers ne possèdent pas de boîte Fur, le site de liaison à l'ADN de la protéine Fur, et on pense qu'ils sont régulés de façon indirecte par cette protéine. Une explication possible pour cette induction est un petit ARN nommé RyhB, qui en présence de fer agit en tant que régulateur négatif réprimé par Fur (Fig. 1.7) (97). Aucune région complémentaire à RyhB n'a été trouvée suite à l'analyse de la région du promoteur de *irf*. Il est donc peu probable que RyhB soit un régulateur direct de l'expression des gènes *irf*. Par une technique de profilage transcriptionnel, 101 gènes régulés par le complexe  $Fe^{2+}$ -Fur ont été identifiés chez *E. coli* (101). Quarante-huit de ceux-ci étaient induits par le fer. Par conséquent, même si Fur a été démontré d'être principalement un répresseur de l'expression de gènes lors de conditions suffisantes en fer, il est aussi un élément de régulation positif sur l'expression de certains promoteurs tels que *pirfA*. La construction d'une fusion *pirfA-lacZYA* à simple copie, soit sur un vecteur ou intégré dans le génome d'une souche *lac-*, nous permettrait d'avoir une idée de l'expression de Irf sous des conditions plus naturelles ainsi que de vérifier rapidement s'il y a variation de phase.

La variation de phase est un mécanisme souvent employé pour réguler l'expression de fimbriae, afin de donner un avantage sélectif aux bactéries. Des éléments de régulation sont souvent impliqués dans ce mécanisme, comme dans le cas des fimbriae P ou des fimbriae de type 1, mais les gènes codant pour les fimbriae IR et LP ne semblent pas avoir des éléments de régulation spécifiques. Même à ça, l'expression des fimbriae LP de *S. typhimurium* est régulée par la variation de phase, mais les mécanismes qui sont

impliqués ne sont pas connus (116). Il n'est pas encore connu si les fimbriae IR sont régulés par la variation de phase. La région du promoteur de *irf* ne contient pas de sites GATC de méthylation Dam, ce qui suggère que ces fimbriae ne sont probablement pas directement régulés par la méthylation Dam. Des études supplémentaires sont requises afin d'élucider les mécanismes de régulation impliqués dans l'expression des fimbriae IR.

#### 4.1 Perspectives

Il serait intéressant de vérifier si un mutant *irf* chez APEC, ou un mutant quadruple de *irf*, *fim*, *tsh* et *csg*, devient atténué lors d'infections expérimentales chez le poulet. L'infection devrait être faite par la voie de l'aérosol pour vérifier s'il y a un effet dans les premières étapes de l'infection, c'est-à-dire l'adhésion et la colonisation des voies respiratoires. L'injection des bactéries directement dans le sac aérien surpasse les premières étapes de colonisation et permet plutôt d'étudier l'effet d'un facteur de virulence dans les étapes de dissémination dans les organes inférieures et dans le sang. Donc, la délétion des gènes *irf* chez la souche  $\chi 7122$  et la complémentation de ce mutant avec les gènes *irf* sur un plasmide seraient des étapes préalables nécessaires aux infections expérimentales chez le poulet. Ainsi, la contribution de Irf de *E. coli* pourrait être vérifiée *in vivo*.

D'autres études de régulation de *irf* pourraient être faites dont l'utilisation de différentes sources de carbone, de milieux de culture, et en modifiant la température de croissance. Il serait intéressant de vérifier l'effet du fer sur l'expression de *irf* dans une souche  $\Delta fur$  dérivée de  $\chi 7122$ . La construction d'une fusion *pirfA-lacZYA* à simple copie dans le génome de la souche QT51 (dérivé  $\Delta lacZYA$  de  $\chi 7122$ ) nous permettrait de vérifier l'expression de *irf* dans des conditions plus naturelles ainsi que de vérifier s'il y a variation de phase.

La production d'anticorps contre l'adhésine, qui est putativement IrfD, devrait permettre de bloquer l'adhérence de ORN103(pIJ2) aux lignées cellulaires testées dans ce mémoire. Ceci nous permettrait de vérifier que l'augmentation d'adhésion observée est vraiment due aux fimbriae IR. Il serait intéressant de voir si l'adhérence est inhibée avec des anticorps contre IrfA, ce qui suggérerait que cette sous-unité ait une fonction d'adhésine. Le marquage des anticorps permettrait aussi de confirmer les structures

observées à la surface des souches ORN172(pIJ39) ainsi que de visualiser les fimbriae Irf à la surface de  $\chi$ 7122, ou d'autres souches possédant ces séquences, par microscopie électronique. De plus, on pourrait vérifier l'expression protéique des fimbriae, par les souches possédant les gènes *irf*, par immunobuvardage de type Western. La caractérisation des différentes sous-unités du fimbriae IR ainsi que l'identification du récepteur de l'adhésine seraient des informations importantes dans la caractérisation subséquente des fimbriae IR.

## Chapitre 5

### Conclusion

Les souches pathogènes de *E. coli* possèdent souvent des facteurs de virulence, absents chez les souches non-pathogènes, qui leur permettent de s'adhérer, de coloniser et de résister aux défenses de l'hôte. Dans le but d'identifier et caractériser un nouveau facteur de virulence chez une souche APEC, nous avons découvert des gènes fimbriaires, nommés *irf*, homologues à *lpf* de *S. typhimurium* et *E. coli* O157:H7. Les gènes *irf* semblent par contre faire partie d'un groupe à part de fimbriae, incluant *stg* de *S. typhi* et *lpf<sub>O113</sub>*, qui se retrouvent dans la région intergénique entre *glmS* et *pstS*. Le fait que le diamètre des fimbriae IR et LP diffère supporte aussi cette observation. Les gènes *irf* sont présents parmi des souches APEC et ExPEC de façon phylogénétique. Par la suite, les gènes *irf* sont associés aux souches APEC, surtout à ceux de séro groupe O78. Certaines adhésines sont présentes chez les souches APEC, mais aucune ne semble être essentielle aux premiers stades d'infection chez la volaille. Nos résultats démontrent que les fimbriae IR pourraient être impliqués dans l'adhérence des tissus respiratoires aviaires et pourraient aussi contribuer à l'adhésion des souches uropathogènes aux cellules épithéliales humaines du tractus urinaire. À ces résultats, nous ajoutons en plus des régulateurs potentiels de l'expression des fimbriae IR, dont la source de carbone et le régulateur global Fur. Des avenues à explorer seraient le rôle des fimbriae IR lors de l'infection chez la volaille et la caractérisation moléculaire de ces fimbriae et plus précisément de déterminer le récepteur cellulaire spécifique auquel adhèrent les fimbriae IR et quels facteurs régulent leur expression.

## Chapitre 6

### Liste des références

1. **Abraham, J. M., C. S. Freitag, J. R. Clements, and B. I. Eisenstein.** 1985. An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:5724-7.
2. **Amor, K., D. E. Heinrichs, E. Fridrich, K. Ziebell, R. P. Johnson, and C. Whitfield.** 2000. Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**:1116-24.
3. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-37.
4. **Arthur, M., R. D. Arbeit, C. Kim, P. Beltran, H. Crowe, S. Steinbach, C. Campanelli, R. A. Wilson, R. K. Selander, and R. Goldstein.** 1990. Restriction fragment length polymorphisms among uropathogenic *Escherichia coli* isolates: *pap*-related sequences compared with *rrn* operons. *Infect Immun* **58**:471-9.
5. **Babai, R., G. Blum-Oehler, B. E. Stern, J. Hacker, and E. Z. Ron.** 1997. Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol Lett* **149**:99-105.
6. **Baumler, A. J., A. J. Gilde, R. M. Tsolis, A. W. van der Velden, B. M. Ahmer, and F. Heffron.** 1997. Contribution of horizontal gene transfer and deletion events to development of distinctive patterns of fimbrial operons during evolution of *Salmonella* serotypes. *J Bacteriol* **179**:317-22.
7. **Baumler, A. J., and F. Heffron.** 1995. Identification and sequence analysis of *lpfABCDE*, a putative fimbrial operon of *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol* **177**:2087-97.
8. **Baumler, A. J., T. L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch, and F. Heffron.** 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **180**:1446-53.
9. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996. Contribution of fimbrial operons to attachment to and invasion of epithelial cell lines by *Salmonella typhimurium*. *Infect Immun* **64**:1862-5.
10. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, and F. Heffron.** 1996. The *lpf* fimbrial operon mediates adhesion of *Salmonella typhimurium* to murine Peyer's patches. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:279-83.
11. **Baumler, A. J., R. M. Tsolis, P. J. Valentine, T. A. Ficht, and F. Heffron.** 1997. Synergistic effect of mutations in *invA* and *lpfC* on the ability of *Salmonella typhimurium* to cause murine typhoid. *Infect Immun* **65**:2254-9.
12. **Bergthorsson, U., and H. Ochman.** 1998. Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* **15**:6-16.
13. **Berkhoff, H. A., and A. C. Vinal.** 1986. Congo red medium to distinguish between invasive and non-invasive *Escherichia coli* pathogenic for poultry. *Avian Dis* **30**:117-21.



14. **Bettelheim, K. A.** 1997. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals, p. 85-109. In M. Sussman (ed.), *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge University Press, Cambridge.
15. **Binns, M. M., J. Mayden, and R. P. Levine.** 1982. Further characterization of complement resistance conferred on *Escherichia coli* by the plasmid genes *traT* of R100 and *iss* of ColV, I-K94. *Infect Immun* **35**:654-9.
16. **Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora, and J. Blanco.** 1997. Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity. *J Clin Microbiol* **35**:2953-7.
17. **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**:1453-74.
18. **Bliss, J. M., C. F. Garon, and R. P. Silver.** 1996. Polysialic acid export in *Escherichia coli* K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. *Glycobiology* **6**:445-52.
19. **Blomfield, I. C., P. J. Calie, K. J. Eberhardt, M. S. McClain, and B. I. Eisenstein.** 1993. Lrp stimulates phase variation of type 1 fimbriation in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* **175**:27-36.
20. **Blyn, L. B., B. A. Braaten, C. A. White-Ziegler, D. H. Rolfson, and D. A. Low.** 1989. Phase-variation of pyelonephritis-associated pili in *Escherichia coli*: evidence for transcriptional regulation. *Embo J* **8**:613-20.
21. **Bree, A., M. Dho, and J. P. Lafont.** 1989. Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors. *Avian Dis* **33**:134-9.
22. **Brinton, C. C., Jr.** 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram negative bacteria. *Trans N Y Acad Sci* **27**:1003-54.
23. **Brown, P. K., and R. Curtiss, 3rd.** 1996. Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:11149-54.
24. **Bullitt, E., and L. Makowski.** 1995. Structural polymorphism of bacterial adhesion pili. *Nature* **373**:164-7.
25. **Cherifi, A., M. Contrepois, B. Picard, P. Goullet, I. Orskov, and F. Orskov.** 1994. Clonal relationships among *Escherichia coli* serogroup O78 isolates from human and animal infections. *J Clin Microbiol* **32**:1197-202.
26. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**:4555-8.
27. **Craig, N. L.** 1989. Transposon Tn7, p. 211-225. In D. E. Berg and M. M. Howe (ed.), *Mobile DNA*. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
28. **Delany, I., G. Spohn, R. Rappuoli, and V. Scarlato.** 2001. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **42**:1297-309.

29. **Der Vartanian, M., B. Jaffeux, M. Contrepois, M. Chavarot, J. P. Girardeau, Y. Bertin, and C. Martin.** 1992. Role of aerobactin in systemic spread of an opportunistic strain of *Escherichia coli* from the intestinal tract of gnotobiotic lambs. *Infect Immun* **60**:2800-7.
30. **Dho, M., and J. P. Lafont.** 1984. Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks. *Avian Dis* **28**:1016-25.
31. **Dho-Moulin, M., and J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**:299-316.
32. **Dorman, C. J., and C. F. Higgins.** 1987. Fimbrial phase variation in *Escherichia coli*: dependence on integration host factor and homologies with other site-specific recombinases. *J Bacteriol* **169**:3840-3.
33. **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**:6761-9.
34. **Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 1994. Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* **38**:231-9.
35. **Dozois, C. M., and R. Curtiss, 3rd.** 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Vet Res* **30**:157-79.
36. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:247-52.
37. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, 3rd.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**:4145-54.
38. **Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel, and M. Bosse.** 1992. *pap*- and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* **60**:2648-56.
39. **Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh, and J. M. Fairbrother.** 1995. Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol* **45**:297-309.
40. **Dutta, P. R., R. Cappello, F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 2002. Functional comparison of serine protease autotransporters of enterobacteriaceae. *Infect Immun* **70**:7105-13.
41. **Eisenstein, B. I., and G. W. Jones.** 1988. The spectrum of infections and pathogenic mechanisms of *Escherichia coli*. *Adv Intern Med* **33**:231-52.
42. **Eisenstein, B. I., D. S. Sweet, V. Vaughn, and D. I. Friedman.** 1987. Integration host factor is required for the DNA inversion that controls phase variation in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:6506-10.
43. **Ellis, M. G., L. H. Arp, and S. J. Lamont.** 1988. Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys. *Am J Vet Res* **49**:2034-7.

44. **Emery, D. A., K. V. Nagaraja, D. P. Shaw, J. A. Newman, and D. G. White.** 1992. Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys. *Avian Dis* **36**:504-11.
45. **Ewing, W. H.** 1986. *Edwards and Ewing's Identification of Enterobacteriaceae*, 4th Ed. ed. Elsevier Science, New York.
46. **Fernandez, L. A., and J. Berenguer.** 2000. Secretion and assembly of regular surface structures in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **24**:21-44.
47. **Forsman, K., M. Goransson, and B. E. Uhlin.** 1989. Autoregulation and multiple DNA interactions by a transcriptional regulatory protein in *E. coli* pili biogenesis. *Embo J* **8**:1271-7.
48. **Forsman, K., B. Sonden, M. Goransson, and B. E. Uhlin.** 1992. Antirepression function in *Escherichia coli* for the cAMP-cAMP receptor protein transcriptional activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**:9880-4.
49. **Foster, G., H. M. Ross, T. W. Pennycott, G. F. Hopkins, and I. M. McLaren.** 1998. Isolation of *Escherichia coli* O86:K61 producing cyto-lethal distending toxin from wild birds of the finch family. *Lett Appl Microbiol* **26**:395-8.
50. **Gong, M., and L. Makowski.** 1992. Helical structure of P pili from *Escherichia coli*. Evidence from X-ray fiber diffraction and scanning transmission electron microscopy. *J Mol Biol* **228**:735-42.
51. **Gophna, U., M. Barlev, R. Seijffers, T. A. Oelschlager, J. Hacker, and E. Z. Ron.** 2001. Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect Immun* **69**:2659-65.
52. **Goransson, M., P. Forsman, P. Nilsson, and B. E. Uhlin.** 1989. Upstream activating sequences that are shared by two divergently transcribed operons mediate cAMP-CRP regulation of pilus-adhesin in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **3**:1557-65.
53. **Goulet, P., and B. Picard.** 1986. Highly pathogenic strains of *Escherichia coli* revealed by the distinct electrophoretic patterns of carboxylesterase B. *J Gen Microbiol* **132** ( Pt 7):1853-8.
54. **Gray, O. P., S. Thomson, and A. G. Watkins.** 1956. *Escherichia coli* gastro-enteritis. *Arch Dis Child* **31**:340-5.
55. **Gross, W. G.** 1991. Colibacillosis, p. 496-519. *In* B. W. Calnek, H. J. Barnes, C. W. Beard, W. M. Reid, and H. W. Yoder (ed.), *Diseases of poultry*, 9th ed. Iowa State University Press, Ames.
56. **Gross, W. G.** 1994. Diseases Due to *Escherichia coli* in Poultry, p. 237-260. *In* C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford.
57. **Hantke, K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:172-7.
58. **Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch, and G. Winkelmann.** 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3677-82.
59. **Harel, J., and C. Martin.** 1999. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet Res* **30**:131-55.

60. **Henderson, I. R., and J. P. Nataro.** 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect Immun* **69**:1231-43.
61. **Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol* **6**:370-8.
62. **Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye, and T. S. Whittam.** 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**:6175-81.
63. **Holmgren, A., and C. I. Branden.** 1989. Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* **342**:248-51.
64. **Hull, S.** 1997. *Escherichia coli* lipopolysaccharide in pathogenesis and virulence, p. 145-167. *In* M. Sussman (ed.), *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge University Press, Cambridge, U.K.
65. **Hultgren, S. J., C. Hal Jones, and S. Normark.** 1996. Bacterial Adhesins and Their Assembly, p. 2730-2756. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd Ed. ed. ASM Press.
66. **Ike, K., K. Kawahara, H. Danbara, and K. Kume.** 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J Vet Med Sci* **54**:1091-8.
67. **Isaacson, R. E.** 1994. Vaccines against *Escherichia coli* diseases, p. 629-648. *In* C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford.
68. **Jacob-Dubuisson, F., J. Heuser, K. Dodson, S. Normark, and S. Hultgren.** 1993. Initiation of assembly and association of the structural elements of a bacterial pilus depend on two specialized tip proteins. *Embo J* **12**:837-47.
69. **Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski, and A. L. Stell.** 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **183**:78-88.
70. **Johnson, J. R., T. T. O'Bryan, M. Kuskowski, and J. N. Maslow.** 2001. Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infect Immun* **69**:5363-74.
71. **Johnson, J. R., and A. L. Stell.** 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* **181**:261-72.
72. **Jones, C. H., P. N. Danese, J. S. Pinkner, T. J. Silhavy, and S. J. Hultgren.** 1997. The chaperone-assisted membrane release and folding pathway is sensed by two signal transduction systems. *Embo J* **16**:6394-406.
73. **Jones, C. H., J. S. Pinkner, R. Roth, J. Heuser, A. V. Nicholes, S. N. Abraham, and S. J. Hultgren.** 1995. FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:2081-5.
74. **Joya, J. E., T. Tsuji, A. V. Jacalne, M. Arita, T. Tsukamoto, T. Honda, and T. Miwatani.** 1990. Demonstration of enterotoxigenic *Escherichia coli* in diarrheic broiler chicks. *Eur J Epidemiol* **6**:88-90.

75. **Kallenius, G., R. Mollby, S. B. Svenson, I. Helin, H. Hultberg, B. Cedergren, and J. Winberg.** 1981. Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections. *Lancet* **2**:1369-72.
76. **Kaltenbach, L. S., B. A. Braaten, and D. A. Low.** 1995. Specific binding of PapI to Lrp-pap DNA complexes. *J Bacteriol* **177**:6449-55.
77. **Kawula, T. H., and P. E. Orndorff.** 1991. Rapid site-specific DNA inversion in *Escherichia coli* mutants lacking the histonelike protein H-NS. *J Bacteriol* **173**:4116-23.
78. **Klemm, P.** 1986. Two regulatory *fim* genes, *fimB* and *fimE*, control the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *Embo J* **5**:1389-93.
79. **Krogfelt, K. A., and P. Klemm.** 1988. Investigation of minor components of *Escherichia coli* type 1 fimbriae: protein chemical and immunological aspects. *Microb Pathog* **4**:231-8.
80. **Kuehn, M. J., D. J. Ogg, J. Kihlberg, L. N. Slonim, K. Flemmer, T. Bergfors, and S. J. Hultgren.** 1993. Structural basis of pilus subunit recognition by the PapD chaperone. *Science* **262**:1234-41.
81. **La Ragione, R. M., R. J. Collighan, and M. J. Woodward.** 1999. Non-curling of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection. *FEMS Microbiol Lett* **175**:247-53.
82. **La Ragione, R. M., W. A. Cooley, and M. J. Woodward.** 2000. The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *J Med Microbiol* **49**:327-38.
83. **La Ragione, R. M., and M. J. Woodward.** 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**:27-35.
84. **Lan, R., and P. R. Reeves.** 1996. Gene transfer is a major factor in bacterial evolution. *Mol Biol Evol* **13**:47-55.
85. **Lawrence, J. G., and H. Ochman.** 1998. Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:9413-7.
86. **Lichtenstein, C., and S. Brenner.** 1982. Unique insertion site of Tn7 in the *E. coli* chromosome. *Nature* **297**:601-3.
87. **Linggood, M. A., M. Roberts, S. Ford, S. H. Parry, and P. H. Williams.** 1987. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J Gen Microbiol* **133 ( Pt 4)**:835-42.
88. **Lior, H.** 1994. Classification of *Escherichia coli*, p. 31-72. *In* C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans. CAB International, Wallingford.
89. **Loveless, B. J., and M. H. Saier, Jr.** 1997. A novel family of channel-forming, autotransporting, bacterial virulence factors. *Mol Membr Biol* **14**:113-23.
90. **Low, D., B. Braaten, and M. Van Der Woude.** 1996. Fimbriae, p. 146-157. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd Ed. ed. ASM Press.
91. **Mahan, M. J., J. M. Slauch, and J. J. Mekalanos.** 1996. Environmental Regulation of Virulence Gene Expression in *Escherichia*, *Salmonella*, and

- Shigella* spp., p. 2803-2815. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and molecular biology. ASM Press.
92. **Malaviya, R., T. Ikeda, E. Ross, and S. N. Abraham.** 1996. Mast cell modulation of neutrophil influx and bacterial clearance at sites of infection through TNF-alpha. *Nature* **381**:77-80.
  93. **Malaviya, R., E. Ross, B. A. Jakschik, and S. N. Abraham.** 1994. Mast cell degranulation induced by type 1 fimbriated *Escherichia coli* in mice. *J Clin Invest* **93**:1645-53.
  94. **Malaviya, R., E. A. Ross, J. I. MacGregor, T. Ikeda, J. R. Little, B. A. Jakschik, and S. N. Abraham.** 1994. Mast cell phagocytosis of FimH-expressing enterobacteria. *J Immunol* **152**:1907-14.
  95. **Marc, D., P. Arne, A. Bree, and M. Dho-Moulin.** 1998. Colonization ability and pathogenic properties of a *fim*- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**:473-85.
  96. **Maslow, J. N., T. S. Whittam, C. F. Gilks, R. A. Wilson, M. E. Mulligan, K. S. Adams, and R. D. Arbeit.** 1995. Clonal relationships among bloodstream isolates of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **63**:2409-17.
  97. **Masse, E., and S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4620-5.
  98. **Maurer, J. J., T. P. Brown, W. L. Steffens, and S. G. Thayer.** 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **42**:106-18.
  99. **McClain, M. S., I. C. Blomfield, K. J. Eberhardt, and B. I. Eisenstein.** 1993. Inversion-independent phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:4335-44.
  100. **McClain, M. S., I. C. Blomfield, and B. I. Eisenstein.** 1991. Roles of *fimB* and *fimE* in site-specific DNA inversion associated with phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **173**:5308-14.
  101. **McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper, and S. C. Andrews.** 2003. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**:29478-86.
  102. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**:536-40.
  103. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**:494-503.
  104. **Milch, H., S. Nikolnikov, and E. Czirok.** 1984. *Escherichia coli* Col V plasmids and their role in pathogenicity. *Acta Microbiol Hung* **31**:117-25.
  105. **Moll, A., P. A. Manning, and K. N. Timmis.** 1980. Plasmid-determined resistance to serum bactericidal activity: a major outer membrane protein, the *traT*

- gene product, is responsible for plasmid-specified serum resistance in *Escherichia coli*. Infect Immun 28:359-67.
106. **Moon, H. W., and T. O. Bunn.** 1993. Vaccines for preventing enterotoxigenic *Escherichia coli* infections in farm animals. Vaccine 11:213-200.
  107. **Musser, J. M.** 1996. Molecular population genetic analysis of emerged bacterial pathogens: selected insights. Emerg Infect Dis 2:1-17.
  108. **Nataro, J. P., and M. M. Levine.** 1994. *Escherichia coli* Diseases in Humans, p. 285-333. In C. L. Gyles (ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International, Wallingford.
  109. **Neidhardt, F. C.** 1996. *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C.
  110. **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 72:1230-1239.
  111. **Ngeleka, M., J. K. Kwaga, D. G. White, T. S. Whittam, C. Riddell, R. Goodhope, A. A. Potter, and B. Allan.** 1996. *Escherichia coli* cellulitis in broiler chickens: clonal relationships among strains and analysis of virulence-associated factors of isolates from diseased birds. Infect Immun 64:3118-26.
  112. **Nicholson, T. L., and A. J. Baumler.** 2001. *Salmonella enterica* serotype typhimurium elicits cross-immunity against a *Salmonella enterica* serotype enteritidis strain expressing LP fimbriae from the *lac* promoter. Infect Immun 69:204-12.
  113. **Nolan, L. K., S. M. Horne, C. W. Giddings, S. L. Foley, T. J. Johnson, A. M. Lynne, and J. Skyberg.** 2003. Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*. Vet Res Commun 27:101-10.
  114. **Nolan, L. K., R. E. Wooley, J. Brown, K. R. Spears, H. W. Dickerson, and M. Dekich.** 1992. Comparison of a complement resistance test, a chicken embryo lethality test, and the chicken lethality test for determining virulence of avian *Escherichia coli*. Avian Dis 36:395-7.
  115. **Norris, T. L., and A. J. Baumler.** 1999. Phase variation of the *lpf* operon is a mechanism to evade cross-immunity between *Salmonella* serotypes. Proc Natl Acad Sci U S A 96:13393-8.
  116. **Norris, T. L., R. A. Kingsley, and A. J. Bumler.** 1998. Expression and transcriptional control of the *Salmonella typhimurium* *lpf* fimbrial operon by phase variation. Mol Microbiol 29:311-20.
  117. **Nou, X., B. Braaten, L. Kaltenbach, and D. A. Low.** 1995. Differential binding of Lrp to two sets of *pap* DNA binding sites mediated by Pap I regulates Pap phase variation in *Escherichia coli*. Embo J 14:5785-97.
  118. **Nou, X., B. Skinner, B. Braaten, L. Blyn, D. Hirsch, and D. Low.** 1993. Regulation of pyelonephritis-associated pili phase-variation in *Escherichia coli*: binding of the PapI and the Lrp regulatory proteins is controlled by DNA methylation. Mol Microbiol 7:545-53.
  119. **Ochman, H., and J. G. Lawrence.** 1996. Phylogenetics and the amelioration of bacterial genomes. In F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed. ASM Press.

120. **Ochman, H., and R. K. Selander.** 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**:690-3.
121. **Olsen, A., A. Arnqvist, M. Hammar, and S. Normark.** 1993. Environmental regulation of curli production in *Escherichia coli*. *Infect Agents Dis* **2**:272-4.
122. **Olsen, A., A. Arnqvist, M. Hammar, S. Sukupolvi, and S. Normark.** 1993. The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **7**:523-36.
123. **Olsen, A., A. Jonsson, and S. Normark.** 1989. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**:652-5.
124. **Orndorff, P. E., P. A. Spears, D. Schauer, and S. Falkow.** 1985. Two modes of control of *pilA*, the gene encoding type 1 pilin in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **164**:321-30.
125. **Orskov, F., and I. Orskov.** 1983. From the national institutes of health. Summary of a workshop on the clone concept in the epidemiology, taxonomy, and evolution of the enterobacteriaceae and other bacteria. *J Infect Dis* **148**:346-57.
126. **Orskov, I., and F. Orskov.** 1990. Serologic classification of fimbriae. *Curr Top Microbiol Immunol* **151**:71-90.
127. **Orskov, I., and F. Orskov.** 1983. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. *Prog Allergy* **33**:80-105.
128. **Osek, J., M. Weiner, and E. L. Hartland.** 2003. Prevalence of the *lpf*(O113) gene cluster among *Escherichia coli* O157 isolates from different sources. *Vet Microbiol* **96**:259-66.
129. **Otto, B. R., S. J. van Dooren, J. H. Nuijens, J. Luirink, and B. Oudega.** 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. *J Exp Med* **188**:1091-1103.
130. **Ottow, J. C.** 1975. Ecology, physiology, and genetics of fimbriae and pili. *Annu Rev Microbiol* **29**:79-108.
131. **Parreira, V. R., and C. L. Gyles.** 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* **71**:5087-96.
132. **Parreira, V. R., and C. L. Gyles.** 2002. Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **87**:341-52.
133. **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**:529-33.
134. **Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion, and E. Denamur.** 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* **67**:546-53.



135. **Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* **58**:195-213.
136. **Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize, and J. M. Fairbrother.** 1997. Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **22**:331-41.
137. **Pradel, N., S. Leroy-Setrin, B. Joly, and V. Livrelli.** 2002. Genomic subtraction to identify and characterize sequences of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O91:H21. *Appl Environ Microbiol* **68**:2316-25.
138. **Provence, D. L., and R. Curtiss, 3rd.** 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **62**:1369-80.
139. **Provence, D. L., and R. Curtiss, 3rd.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect Immun* **60**:4460-7.
140. **Raetz, C. R. H.** 1996. Bacterial lipopolysaccharides: a remarkable family of bioactive macroamphiphiles, p. 1035-1063. *In* F. C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, 2nd ed, vol. 1. ASM Press, Washington, D.C.
141. **Robison, K., A. M. McGuire, and G. M. Church.** 1998. A comprehensive library of DNA-binding site matrices for 55 proteins applied to the complete *Escherichia coli* K-12 genome. *J Mol Biol* **284**:241-54.
142. **Romling, U., W. D. Sierralta, K. Eriksson, and S. Normark.** 1998. Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the *agfD* promoter. *Mol Microbiol* **28**:249-64.
143. **Russo, T. A., U. B. Carlino, A. Mong, and S. T. Jodush.** 1999. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infect Immun* **67**:5306-14.
144. **Salvadori, M. R., T. Yano, H. E. Carvalho, V. R. Parreira, and C. L. Gyles.** 2001. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* **45**:43-51.
145. **Saulino, E. T., D. G. Thanassi, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren.** 1998. Ramifications of kinetic partitioning on usher-mediated pilus biogenesis. *Embo J* **17**:2177-85.
146. **Schilling, J. D., M. A. Mulvey, and S. J. Hultgren.** 2001. Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**:S36-40.
147. **Sekizaki, T., I. Nonomura, and Y. Imada.** 1989. Loss of virulence associated with plasmid curing of chicken pathogenic *Escherichia coli*. *Nippon Juigaku Zasshi* **51**:659-61.
148. **Sjoberg, U., G. Pohl, and A. Olsen.** 1994. Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Mol Microbiol* **14**:443-52.

149. **Soto, G. E., K. W. Dodson, D. Ogg, C. Liu, J. Heuser, S. Knight, J. Kihlberg, C. H. Jones, and S. J. Hultgren.** 1998. Periplasmic chaperone recognition motif of subunits mediates quaternary interactions in the pilus. *Embo J* **17**:6155-67.
150. **Soto, G. E., and S. J. Hultgren.** 1999. Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J Bacteriol* **181**:1059-71.
151. **Stathopoulos, C., D. L. Provence, and R. Curtiss, 3rd.** 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect Immun* **67**:772-81.
152. **Stawski, G., L. Nielsen, F. Orskov, and I. Orskov.** 1990. Serum sensitivity of a diversity of *Escherichia coli* antigenic reference strains. Correlation with an LPS variation phenomenon. *Apmis* **98**:828-38.
153. **Striker, R., U. Nilsson, A. Stonecipher, G. Magnusson, and S. J. Hultgren.** 1995. Structural requirements for the glycolipid receptor of human uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **16**:1021-9.
154. **Stromberg, N., B. I. Marklund, B. Lund, D. Ilver, A. Hamers, W. Gaastra, K. A. Karlsson, and S. Normark.** 1990. Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal alpha 1-4Gal-containing isoreceptors. *Embo J* **9**:2001-10.
155. **Sukupolvi, S., and C. D. O'Connor.** 1990. TraT lipoprotein, a plasmid-specified mediator of interactions between gram-negative bacteria and their environment. *Microbiol Rev* **54**:331-41.
156. **Sussman, M.** 1997. *Escherichia coli* and human disease, p. 3-48. *In* M. Sussman (ed.), *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*. Cambridge University Press, Cambridge.
157. **Taylor, P. W.** 1983. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **47**:46-83.
158. **Thanassi, D. G., E. T. Saulino, M. J. Lombardo, R. Roth, J. Heuser, and S. J. Hultgren.** 1998. The PapC usher forms an oligomeric channel: implications for pilus biogenesis across the outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3146-51.
159. **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**:5416-27.
160. **Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch, and S. M. Payne.** 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun* **69**:6179-85.
161. **Townsend, S. M., N. E. Kramer, R. Edwards, S. Baker, N. Hamlin, M. Simmonds, K. Stevens, S. Maloy, J. Parkhill, G. Dougan, and A. J. Baumler.** 2001. *Salmonella enterica* serovar *Typhi* possesses a unique repertoire of fimbrial gene sequences. *Infect Immun* **69**:2894-901.
162. **Truscott, R. B.** 1973. Studies on the chick-lethal toxin of *Escherichia coli*. *Can J Comp Med* **37**:375-81.

163. **Valvano, M. A.** 1992. Diphenylamine increases cloacin DF13 sensitivity in avian septicemic strains of *Escherichia coli*. *Vet Microbiol* **32**:149-61.
164. **van der Velden, A. W., A. J. Baumler, R. M. Tsois, and F. Heffron.** 1998. Multiple fimbrial adhesins are required for full virulence of *Salmonella typhimurium* in mice. *Infect Immun* **66**:2803-8.
165. **Van Dijk, W. C., H. A. Verbrugh, M. E. van der Tol, R. Peters, and J. Verhoef.** 1979. Role of *Escherichia coli* K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infect Immun* **25**:603-9.
166. **Vidotto, M. C., Cacao, C. R. Goes, and D. S. Santos.** 1991. Plasmid coding for aerobactin production and drug resistance is involved in virulence of *Escherichia coli* avian strains. *Braz J Med Biol Res* **24**:649-75.
167. **Waters, V. L., and J. H. Crosa.** 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* **55**:437-50.
168. **White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson, and T. S. Whittam.** 1993. Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin. *Microb Pathog* **14**:399-409.
169. **Whittam, T. S., H. Ochman, and R. K. Selander.** 1983. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**:1751-5.
170. **Wooley, R. E., L. K. Nolan, J. Brown, P. S. Gibbs, C. W. Giddings, and K. S. Turner.** 1993. Association of K-1 capsule, smooth lipopolysaccharides, *traT* gene, and Colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **37**:1092-6.
171. **Wooley, R. E., K. R. Spears, J. Brown, L. K. Nolan, and O. J. Fletcher.** 1992. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **36**:679-84.
172. **Yerushalmi, Z., N. I. Smorodinsky, M. W. Naveh, and E. Z. Ron.** 1990. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. *Infect Immun* **58**:1129-31.
173. **Zhang, L., B. Foxman, and C. Marrs.** 2002. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol* **40**:3951-5.

