

Facteurs de virulence et propriétés spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli* :

II) Franchissement des muqueuses et propriétés invasives

MAINIL J.

Département des maladies infectieuses et parasitaires – Bactériologie
Faculté de Médecine vétérinaire – Université de Liège – Sart Tilman, Bât B43a – B4000 Liège

Correspondance : Professeur Jacques Mainil
Tél: 04/366 40 50 – FAX: 04/366 42 61 – Email : jg.mainil@ulg.ac.be

RESUME : L'espèce *Escherichia coli* est subdivisée en de nombreuses souches pathogènes pour l'homme et les animaux sur base de la possession de propriétés ou de la production de facteurs spécifiques qui sont responsables de leur pouvoir pathogène. Ces souches pathogènes sont classiquement divisées en souches à tropisme intestinal (entérotoxigènes, entéro-pathogènes, entéro-hémorragiques, vérotoxino-gènes et entéro-invasives) et en souches à tropisme extra-intestinal (uropathogènes et invasives). Les souches invasives provoquent des septicémies et/ou des bactériémies avec localisations dans différents organes (infections systémiques). Si les propriétés et facteurs spécifiques de virulence des souches à tropisme intestinal sont relativement bien connus et caractérisés, ceux des souches à tropisme extra-intestinal le sont beaucoup moins, surtout chez les animaux.

Le but de cette série d'articles de revue est de présenter les connaissances sur les propriétés et facteurs spécifiques des souches à tropisme extra-intestinal : les adhésines et facteurs de colonisation, le franchissement des muqueuses et la survie dans le sang et les organes internes, les propriétés toxiques. Le quatrième article fera le point sur les souches invasives elle-mêmes, particulièrement les souches nécrotogènes.

Ce deuxième article présente donc les connaissances actuelles sur le franchissement des muqueuses, la résistance aux activités du complément et à la phagocytose ainsi que la production de colicines, qui furent, pendant un certain nombre d'années, considérées comme une propriété spécifique importante des souches invasives de colibacilles.

FRANCHISSEMENT DES MUQUEUSES

Les bactéries qui colonisent les surfaces muqueuses ne peuvent traverser la couche de l'épithélium grâce à l'existence de jonctions serrées entre les cellules épithéliales, notamment à hauteur de l'intestin.

Les bactéries invasives ont développé divers mécanismes qui leur permettent de franchir les épithéliums malgré ces défenses. En voici trois exemples (Salyers et Whitt, 1994) :

- pénétration via les cellules M des plaques de Peyer suivie de pénétration dans les entérocytes par la base et extension collatérale (*Shigella* et souches entéro-invasives d'*E. coli* ou EIEC) ;
- pénétration via les cellules M des plaques de Peyer suivie d'invasion de la sous-muqueuse et de dissémination plus ou moins lointaine selon les espèces (*Yersinia*) ;
- pénétration via les entérocytes après réorganisation des microvillosités et du cytosquelette suivie de

transcytose et de dissémination (*Salmonella*).

Par contre, les mécanismes de pénétration des souches invasives septicémiques et systémiques d'*E. coli* restent inconnus aujourd'hui, même si des propriétés d'invasion de cellules épithéliales en culture ont été observés (Korth *et al.*, 1994). La seule hypothèse actuelle est l'action possible jouée par les Facteurs Cytotoxiques Nécrosants (toxines CNF) et par les Toxines Cytoléthales Distandantes (CDT) sur les entéro-

cytes (voir article III). Mais nombre de souches invasives ne produisent pas ces toxines CNF et/ou CDT et le problème reste donc entier.

PROPRIETES INVASIVES

Après le franchissement des barrières cutanée ou muqueuse, les bactéries invasives vont tenter de se multiplier dans le sang et de se distribuer dans l'ensemble des organes internes. Pour ce faire, elles doivent surmonter diverses défenses internes de l'hôte qui se répartissent en défenses constitutives et en défenses acquises (Salyers et Whitt, 1994; 2002). Ce chapitre est consacré aux propriétés bactériennes leur permettant de combattre trois défenses internes constitutives : la séquestration du Fer, la phagocytose et l'activité bactéricide du complément. Les défenses acquises, spécifiques de l'agent infectieux et représentées par les réponses du système immunitaire ne seront pas abordées. Ce chapitre sera complété par la description des colicines qui furent, à une époque, considérées comme une propriété spécifique des souches invasives d'*E. coli*.

L'approvisionnement en Fer

Le fer est présent en grande quantité dans le sang et les tissus de l'homme et des animaux, mais le fer libre, sous forme d'ions ferreux, seul utilisable par les bactéries, est présent en très faibles quantités (10^{-18} molaire). Le fer se trouve, en fait, dans les cellules, lié à l'hème, à l'hémosidérine, à la ferritine, et, dans le milieu extracellulaire, lié à des glycoprotéines comme la transferrine dans le plasma, le liquide céphalorachidien et la perspiration ou la lactoferrine dans le lait et les sécrétions et excréments. La constante d'affinité de ces protéines pour le fer est très élevée (10^{36}) et elles ne sont que partiellement saturées (30 à 40% pour la transferrine sérique humaine) (Griffiths *et al.*, 1988; Griffiths, 1994; 1997; Salyers et Whitt, 1994; 2002).

Les rôles physiologiques de la transferrine et de la lactoferrine sont de chélater et de livrer les ions fer aux cellules eucaryotes. Les concentrations en fer libre dans les fluides corporels diminuent jusqu'à des valeurs extrêmement basses (10^{-18} molaire), empêchant les bactéries de s'approvi-

sionner en fer et limitant ainsi fortement leurs métabolismes enzymatiques et respiratoire et, donc, leur croissance.

Mécanismes de contournement des systèmes de séquestration du Fer

Les bactéries peuvent s'approvisionner en fer selon cinq stratégies différentes (Griffiths *et al.*, 1988; Guérinot, 1994; Ratledge et Dover, 2000):

- à partir des produits de dégradation de l'hémoglobine après hémolyse;
- directement à partir de la transferrine ou la lactoferrine de l'hôte;
- indirectement à partir de ces deux mêmes molécules par la production de sidérophores;
- indirectement à partir de sidérophores produits par d'autres bactéries;
- à partir des pools intracellulaires de fer pour les bactéries pathogènes intracellulaires facultatives et obligées (ce que n'est pas *E. coli*).

La première stratégie est celle utilisée par les bactéries produisant des hémolysines, car elles sont en plus capables de digérer l'hémoglobine et d'assimiler les porphyrines. Les hémolysines d'*E. coli* peuvent jouer ce rôle, mais, à lui seul, ce mécanisme est insuffisant. De plus, beaucoup de souches invasives d'*E. coli* ne produisent pas d'hémolysine.

La deuxième stratégie consiste en la synthèse de récepteurs à la transferrine et/ou à la lactoferrine. Les possibilités de liaison s'étendent aux sidérophores de plusieurs espèces animales (Griffiths *et al.*, 1988; Guérinot, 1994). Cette stratégie n'a pas été décrite pour *E. coli*.

Pour la troisième stratégie, qui est la plus efficace et la plus répandue dans le monde des bactéries pathogènes, des sidérophores de très haute affinité sont produits pour détacher le fer des chélateurs de l'hôte. Ces sidérophores sont des composés d'hydroxamate ou de catéchols de 0,5 à 1,0 kDa (Griffiths, 1997) dont la synthèse est activée par la déficience en fer. Ils sont excrétés dans le milieu extérieur, fixent le fer et soit sont transportées directement dans le cytoplasme bactérien, soit se fixent eux-mêmes sur un récepteur membranaire spécifique. Le fer est ensuite libéré à l'état ferreux. La synthèse de tels sidérophores a été démontrée pour diverses bacté-

ries Gram positives et Gram négatives et les systèmes des entérobactéries sont les mieux connus.

Comme nombre d'autres bactéries, *E. coli* peut aussi utiliser des sidérophores produits par d'autres bactéries et par des champignons : ferrichrome, coprogène ou acide rhodotorulique. *E. coli* peut en effet synthétiser des récepteurs à ces différents sidérophores (Griffiths, 1994; 1997; Ratledge et Dover, 2000). L'association de ces systèmes avec le pouvoir pathogène n'a pas été établie, mais ils pourraient jouer un rôle dans les cas d'infections mixtes.

Les sidérophores produits (figure 1)

Le système le plus répandu chez les entérobactéries est celui d'un catéchol appelé entérochéline ou entérobactine, dont la description pour *E. coli* remonte à la fin des années '60 (Brot et Goodwin, 1968; O'Brien et Gibson, 1970; Griffiths, 1997). La synthèse d'entérobactine est induite lors d'une restriction en fer par le système Fur (**F**erric **U**ptake **R**egulation). Selon les conditions, sa constante d'affinité pour le fer varie entre 10^{37} et 10^{56} (Griffiths, 1997).

Après capture du fer, une molécule d'entérobactine interagit avec un récepteur spécifique (FepA) présent dans la membrane externe et dont la synthèse est corégluée avec sa propre synthèse. Le transfert de l'entérobactine au travers du périplasme et des membranes est un mécanisme énergétique actif, sous le contrôle du système TonB. Ce transport se fait par liaison avec un récepteur du périplasme (FepB) suivi d'une liaison avec un récepteur présent dans la membrane cytoplasmique. La dissociation du complexe entérobactine- Fe^{+++} se fait après réduction enzymatique en Fe^{++} avec intervention de NADP. Les ions Fe^{++} solubles sont libérés dans le cytoplasme bactérien et sont récupérés par des transporteurs spécifiques (Griffiths, 1997; Ratledge et Dover, 2000). Une molécule d'entérobactine transporte donc un ion ferrique jusque dans le cytoplasme bactérien, mais ne peut être utilisée qu'une fois.

Un autre type de chélateur bactérien est l'aérobactine, un hydroxamate, dont la description pour *E. coli* remonte à la fin des années '70, mais décrit à l'origine dans le genre

Aerobacter (Gibson et Magrath, 1969; Williams, 1979; Griffiths, 1997). Contrairement à l'entérobactine, l'aérobactine délivre l'ion ferrique à un récepteur spécifique (IutA) présent dans la membrane externe de la cellule bactérienne et dont la synthèse est coréglée avec sa propre synthèse. Le fer est ensuite transporté vers la membrane cytoplasmique par un autre système énergie-dépendant, encore mal caractérisé (Griffiths, 1994; 1997). Par rapport à l'entérobactine, l'aérobactine est recyclée après libération du Fe^{+++} , ne se lie pas à l'albumine dans le sérum et peut agir à des pH acides, comme ceux rencontrés lors de processus inflammatoire (Griffiths, 1997; Ratledge et Dover, 2000). Mais sa constante d'affinité est plus faible (10^{25}) que celle de l'entérobactine. Bien que la production d'aérobactine soit associée à un pouvoir invasif des bactéries, sa neutralisation par des anticorps spécifiques ne protège pas l'animal contre l'infection et la maladie (Pohl, communication personnelle; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

Un troisième type de chélateur du fer a été récemment mis en évidence chez *E. coli* : il s'agit du système yersinia-bactine décrit à l'origine dans le genre *Yersinia* (Pelludat *et al.*, 1998; Schubert *et al.*, 1998; Karch *et al.*, 1999). Peu d'éléments de ce système

sont cependant connus chez *E. coli*. Il a aussi été montré que d'autres mécanismes, tel que la production de citrate, sont utilisés par certaines souches d'*E. coli* capables de croître en milieu appauvri en fer (Griffiths, 1994; 1997).

Rôle en pathologie

Les premières données concernant un possible rôle de l'entérobactine et/ou de l'aérobactine dans les pathologies colibacillaires trouvent leur origine dans les observations épidémiologiques sur leur production par des souches invasives d'*E. coli* (Carbonetti *et al.*, 1986; Linggood *et al.*, 1987), mais la démonstration incontestable de leur rôle dans la pathogénie des colibacillooses reste à faire (Griffiths, 1994).

En ce qui concerne l'entérobactine, le principal argument en faveur d'un rôle est la démonstration de sa production *in vivo* par des bactéries pathogènes (Griffiths et Humphreys, 1980). Par contre, des observations épidémiologiques ultérieures ont montré que sa production n'est pas limitée aux souches pathogènes de cette espèce (Griffiths, 1994).

Les données épidémiologiques ont, par contre, confirmé que la production d'aérobactine est restreinte aux

souches à potentiel invasif et uropathogènes d'*E. coli* chez les animaux et l'homme, ainsi qu'aux souches entéro-invasives chez l'homme (Carbonetti *et al.*, 1986; Linggood *et al.*, 1987; Oswald *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992; Fairbrother, 1993; Mainil, 1993; Nataro et Levine, 1994; Fairbrother et Ngeleka, 1994; Gay et Besser, 1994; Griffiths, 1994; 1997; Donnenberg et Welch, 1996; Beutin, 1999; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Mainil *et al.*, 1999; 2001).

En ce qui concerne son rôle exact dans la pathogénie des souches invasives, il faut faire référence aux travaux de Smith et collaborateurs (Smith, 1974; Smith et Huggins, 1976; 1980) sur le plasmide ColV : les souches de colibacilles possédant ce plasmide sont nettement plus létales en injection parentérale chez le porcelet et la souris que les autres souches et des souches K12 de laboratoire ayant acquis le plasmide ColV deviennent, dans ces modèles, aussi létales que les souches sauvages d'origine. Il a été montré, par la suite, que ce plasmide ColV est porteur de gènes codant pour l'aérobactine (Williams, 1979). Il a aussi été montré que l'introduction des gènes qui codent pour l'aérobactine dans la souche sauvage d'origine délétée de ce plasmide ColV, suffit à rétablir le pouvoir pathogène de cette souche dans le modèle d'injection péritonéale chez la souris (Roberts *et al.*, 1989). L'interprétation aujourd'hui des résultats obtenus par Smith et collaborateurs est cependant d'autant plus complexe que les plasmides ColV sont hétérogènes et que certains d'entre eux codent aussi pour d'autres fonctions, comme la résistance à l'activité bactéricide du complément. Quant à l'aérobactine des souches entéro-invasives, elle pourrait jouer un rôle dans l'approvisionnement en fer à partir des réserves intracellulaires liées à la ferritine (Griffiths, 1994; 1997).

Il faut aussi se poser la question de l'avantage des souches pathogènes qui produisent les deux systèmes sur les souches qui ne produisent que l'entérobactine, surtout si l'on se souvient que la constante d'affinité pour le fer de l'aérobactine est plus faible que celle de l'entérobactine. L'absence de souches sauvages entérobactine-négatives aérobactine-positives ne permet pas de répondre direc-

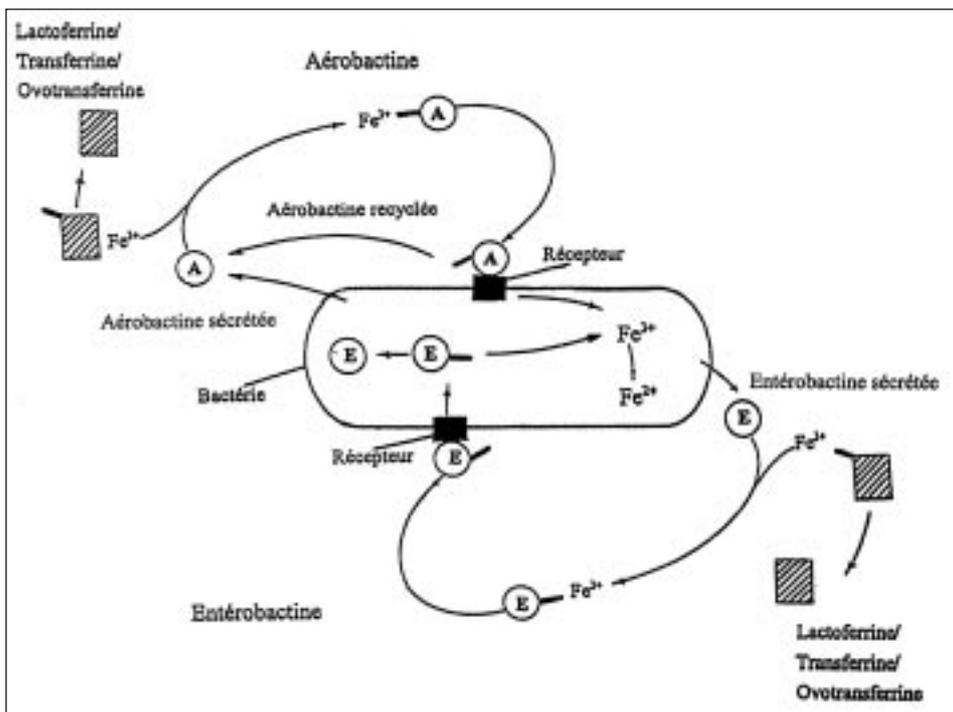


Figure 1: Schémas et comparaisons des mécanismes d'action de l'entérobactine (E) et de l'aérobactine (A) comme agents bactériens de chélation du fer (inspiré de Griffiths *et al.*, 1988).

tement à cette question. Mais les propriétés particulières de l'aérobactine par rapport à l'entérobactine (recyclage, non liaison à la sérulalbumine, activité à pH acide) (Griffiths, 1994; 1997) permettent d'imaginer un avantage dans certaines conditions extrêmes *in vivo*, particulièrement à de faibles doses infectantes (Smith et Huggins, 1980).

Quant aux autres systèmes, la démonstration de leur rôle en pathologie attend toujours. Notons cependant, que le système yersiniabactine, que l'on retrouve chez des souches septicémiques, entéroaggrégatives, entéropathogènes et entérohémorragiques d'*E. coli* humaines et animales (Schubert *et al.*, 1998; Karch *et al.*, 1999; Gophna *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2001), n'est produit que par des souches de *Yersinia* hautement pathogènes pour la souris et qu'une mutation dans ce système en réduit fortement la virulence dans le même modèle (Carniel *et al.*, 1992; Pelludat *et al.*, 1998). Il a aussi été récemment démontré que ce système contribue à la virulence des souches extra-intestinales d'*E. coli* dans un modèle invasif chez la souris (Schubert *et al.*, 2002).

Déterminisme génétique

La synthèse de l'entérobactine est sous la dépendance de six gènes, *entA-F* (**ENT**erobactin), situés sur le chromosome. Sept autres gènes (*fepA-G*; **Ferric-Enterobactin Protein**) permettent la synthèse du récepteur membranaire FepA et du transporteur périplasmique FepB et un autre gène (*fes*; **Ferric-Enterobactin System**) intervient dans la synthèse d'une enzyme estérase qui agit sur l'entérobactine après son entrée dans le cytoplasme pour libérer les ions ferreux. Il faut y ajouter les gènes qui codent pour les réductases et *tonB* (pour sensibilité au phage **T-One**) qui code pour ce système de transport du même nom (Griffiths, 1997; Ratledge et Dover, 2000).

La synthèse de l'aérobactine est sous la dépendance de cinq gènes qui codent pour l'aérobactine (*iuc*; **Iron-Uptake Chelate**) et son récepteur membranaire (*iut*; **Iron-Uptake Transport**) (Carbonetti et Williams, 1984) à localisation plasmidique, notamment, mais pas exclusivement, sur des plasmides ColV (Crosa, 1984), dans les souches invasives humaines et animales, ou à localisa-

tion chromosomique dans les souches entéro-invasives humaines. Il a été suggéré que ces gènes fassent partie d'un ancien transposon. Comme pour l'entérobactine, il faut ajouter divers gènes chromosomiques à fonctions multiples, dont *tonB* et *fhuA* (**Ferric Hydroxamate Uptake**) (Griffiths, 1997; Ratledge et Dover, 2000).

L'expression des gènes *ent*, *fep*, *iut* et autres est sous la dépendance du régulateur global Fur (= régulon). A haute concentration en Fe⁺⁺, le système Fur réprime leur expression. Au contraire, lors de faibles concentrations en Fe⁺⁺, le système Fur a peu d'affinité pour les promoteurs de ces gènes (Braun, 1985; Guerinot, 1994; Griffiths, 1994; 1997; Harel et Martin, 1999).

En ce qui concerne le système yersiniabactine, divers gènes ont aussi été mis en évidence, aussi bien chez *E. coli* que chez *Yersinia*: *irp1* à *irp5* (**Iron-Repressed Proteins**) qui interviennent dans la synthèse de la yersiniabactine et *fyuA* (**Ferric Yersiniabactine Uptake**) qui code pour son récepteur membranaire. Ces gènes sont regroupés sur l'îlot de pathogénicité HPI (**High-Pathogenicity Island**) de *Yersinia* (Pelludat *et al.*, 1998).

Depuis le séquençage du chromosome d'*E. coli* K-12 et de deux souches entérohémorragiques du sérotype O157:H7, des séquences correspondant à d'autres systèmes potentiels d'utilisation du fer ont été mis en évidence, dont les fréquences, expression et rôle en pathologie devront être évalués dans le futur (Perna *et al.*, 2002).

Mise en évidence

Le système entérobactine étant répandu dans toutes les souches sauvages d'*E. coli* (Griffiths, 1997) et les autres systèmes n'étant pas entièrement caractérisés, seule la recherche du système aérobactine par tests phénotypiques est effectuée au laboratoire, particulièrement sur des souches isolées du sang ou d'organes internes.

Les tests phénotypiques décrits peuvent différer quelque peu, mais sont basés sur le principe d'une co-culture sur gélose agar appauvrie en fer de la souche à tester et d'une souche de laboratoire déficiente en entérobactine et en aérobactine, mais encore capable de synthétiser le récepteur à l'aérobactine. La production d'aéro-

bactine par la souche à tester permettra la croissance de la souche de laboratoire. Ce test peut aussi être adapté à une croissance en milieu liquide (Schoch et Lebek, 1984; Carbonetti et Williams, 1985; Linggood *et al.*, 1987; Fairbrother *et al.*, 1989; Pohl *et al.*, 1992).

Les tests génétiques consistent en l'hybridation sur colonies avec diverses sondes génétiques dérivées des gènes *iut* (Carbonetti *et al.*, 1986; Linggood *et al.*, 1987; Fernandez-Beros *et al.*, 1990; Bollmann *et al.*, 1997) et en tests PCR (Yamamoto *et al.*, 1995; Gophna *et al.*, 2001; Janssen *et al.*, 2001; Moulin-Schouleur, communication personnelle).

Les gènes *fyu* et *irp2* du système yersiniabactine ont été mis en évidence dans les souches d'*E. coli* par des tests PCR essentiellement (Schubert *et al.*, 1998; Karch *et al.*, 1999; Janssen *et al.*, 2001; Gophna *et al.*, 2001).

La résistance aux activités du complément (figure 2)

Le complément représente un ensemble de protéines sériques (C1 à C9) qui, suite à leur activation, vont attirer les phagocytes, opsoniser les bactéries et former un complexe d'attaque membranaire (**Membrane Attack Complex** ou MAC) qui s'insère dans la membrane externe des bactéries à Gram négatif, ce qui entraîne leur mort et leur lyse, dans certaines conditions (Taylor, 1988; Salyers et Whitt, 1994; 2002).

La voie dite classique d'activation du complément est enclenchée par des anticorps liés aux bactéries après fixation de C1, tandis que la voie dite alternative l'est par des molécules de surface des bactéries, telles le lipopolysaccharide des Gram négatives et les acides teichoïques des Gram positives après fixation de C3b, qui provient du clivage naturel à bas niveau dans le sérum de C3. Les phagocytes possèdent à leur surface des récepteurs pour C3b, d'où l'action opsonisante du complément. Suite à cette liaison, C3b est activé et peut former un complexe avec Bb, un produit de clivage d'une autre protéine sérique, formant la C3 convertase qui entretient de manière autocatalytique le clivage de C3 en C3b et C3a, qui active les phagocytes. Une autre C3 convertase est formée

par C2 et C4 dans la voie classique après action de C1.

Lorsque le complexe C3bBb lie une seconde molécule C3b, il forme la C5 convertase. La C5 convertase clive le produit C5 en C5a, qui attire les phagocytes, et en C5b, qui se fixe à une chaîne latérale de l'antigène O du LPS des bactéries Gram négatives puis lie C6, C7, C8. Ce complexe se fixe dans la membrane externe des bactéries et, finalement lie plusieurs copies de C9 (= MAC). Le MAC forme un pore dans la membrane externe, qui pourrait s'étendre aussi à la membrane cytoplasmique. La mort de la bactérie peut être suivie de sa lyse dans certaines conditions, en présence de lysozyme par exemple (= action lytique du complément).

Les premières observations sur la résistance des bactéries à l'activité bactéricide du complément (ou résistance au sérum, RS) remontent au début des années '50 (Rowley, 1956) et sur son implication dans la virulence bactérienne, à la fin de la même décennie (Roantree et Rantz, 1960). L'identification des structures associées à ce phénomène s'est ensuite faite progressivement au cours des années (Woolcock, 1988), mais les

mécanismes moléculaires ne sont pas encore connus avec certitude. Cette résistance à l'activité bactéricide du complément peut agir à différents niveaux : défaut d'activation ou de liaison de certains intermédiaires, dégradation des intermédiaires, blocage de l'accès du complexe MAC (C5b-9) à la surface bactérienne (Borkowska-Opacka, 1971 ; Taylor, 1988 ; Ngeleka *et al.*, 1992 ; Hirsch *et al.*, 1993 ; Gay et Besser, 1994 ; Salyers et Whitt, 1994 ; 2002 ; Donnenberg et Welch, 1996 ; Johnson, 1997 ; Mac Laren, 1997 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

Mécanismes et rôle en pathologie

Il est logique que la résistance à l'activité bactéricide du complément trouve son origine dans des structures présentes à la surface du corps bactérien qui empêchent l'activation de la voie alternative du complément : antigènes O du LPS, capsules et protéines de membrane externe. Cependant, la résistance conférée par ces structures n'est pas absolue, car ces bactéries ne peuvent empêcher le dépôt dans leur membrane externe du complexe C5b-C8, si la voie classique est activée

(Taylor, 1988 ; Woolcock, 1988 ; Czirok *et al.*, 1990 ; Salyers et Whitt, 1994 ; 2002 ; Whitfield *et al.*, 1994 ; Jann et Jann, 1997 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Russo, 2002).

L'exemple le plus connu est l'antigène capsulaire K1, contenant de l'acide N-acétyl-neuraminidique, des *E. coli* associés à des méningites chez l'homme et à des infections systémiques chez la volaille. Cet antigène est, de plus, peu immunogène et active donc peu la voie classique. Des souches humaines mutées dans les gènes qui codent pour l'antigène K1 sont ainsi beaucoup moins pathogènes que les souches sauvages dans des modèles animaux invasifs. L'antigène capsulaire K"V165" de souches invasives septicémiques bovines et porcines joue un rôle similaire (Fairbrother et Ngeleka, 1994).

Les antigènes somatiques O interviennent également dans la résistance à l'activité bactéricide du complément. En effet, s'il est vrai que le LPS peut activer la voie alternative de la cascade du complément, il apparaît aussi que certains antigènes O particulièrement ramifiés, bloquent la cascade, en prévenant le dépôt de facteur C3b. Un autre mécanisme de résistance déterminé par des antigènes O ramifiés consiste à empêcher le dépôt stable du complexe C5b-C8 dans la membrane bactérienne avant la fixation du composant C9. Des mutants R (Rugueux), qui ne produisent pas d'antigène O, ne peuvent en effet prévenir ce complexe de s'associer de manière stable à la membrane externe. Ces différentes activités pourraient être la conséquence de l'encombrement stérique provoqué par les chaînes latérales de l'antigène O (Taylor, 1988 ; Woolcock, 1988 ; Whitfield *et al.*, 1994 ; Salyers et Whitt, 1994 ; 2002 ; Hull, 1997).

Enfin, il est connu que certaines protéines insérées dans la membrane externe (Iss, Tra T, OmpA...) permettent aux souches qui les produisent de résister à l'activité bactéricide du complément. Le mode d'action, direct (inhibition du dépôt du MAC ?) ou indirect (diminution de la fluidité membranaire ?), de ces protéines n'est pas connu, mais leur présence est associée à un pouvoir invasif (Taylor, 1988 ; Woolcock, 1988 ; Hancock et Piers, 1994).

Quel qu'en soit le mécanisme, la résistance à l'activité bactéricide du

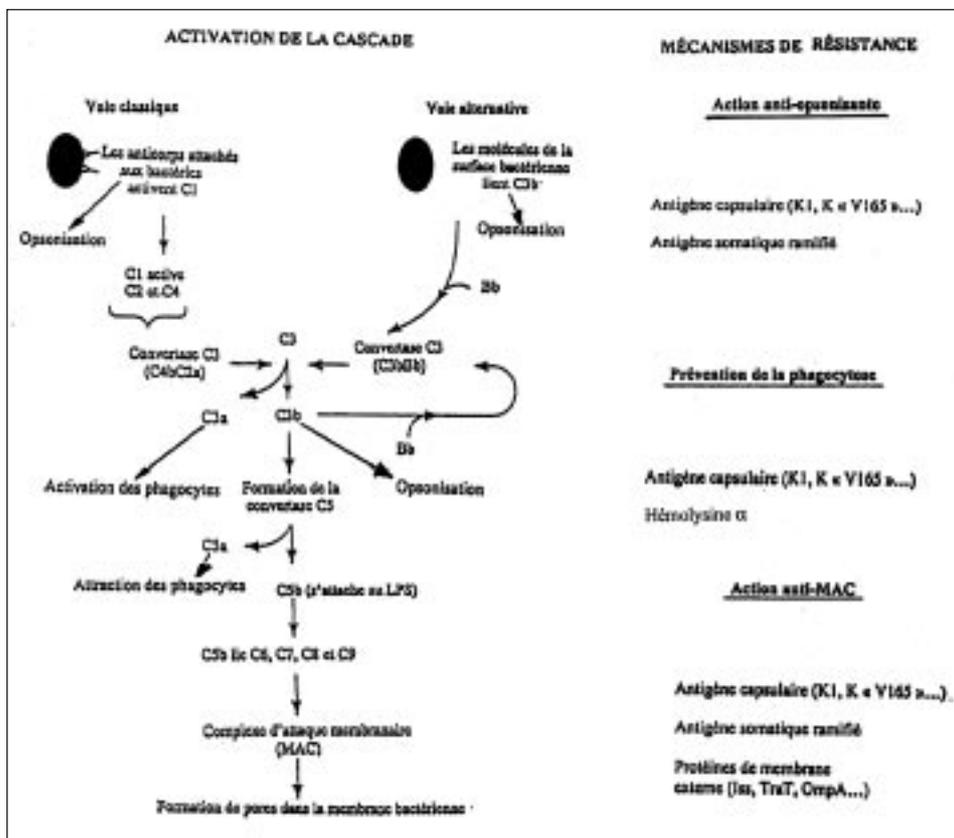


Figure 2 : Schéma de la cascade du complément et présentation des structures qui permettent aux bactéries de résister à ses activités opsonisante et lytique et à la phagocytose (adapté de Salyers et Whitt, 1994).

complément est l'apanage des souches invasives et systémiques (Oswald *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992; Fairbrother, 1993; Mainil, 1993; Nataro et Levine, 1994; Fairbrother et Ngeleka, 1994; Gay et Besser, 1994; Donnenberg et Welch, 1996; Beutin, 1999; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Mainil *et al.*, 1999; 2001).

Déterminisme génétique

Les antigènes O et K sont codés par divers gènes à localisation chromosomique (Whitfield *et al.*, 1994; Jann et Jann, 1997; Hull, 1997; Russo, 2002). Les protéines de membrane externe impliquées dans cette augmentation de la résistance peuvent être codées par des gènes plasmidiques : *iss* (*Increased Survival in Serum*) sur des plasmides ColV, *traT* sur les plasmides ColV, R6-5, R100 (*traT* fait partie de l'opéron de **TR**Ansfer par conjugaison de ces plasmides); ou chromosomiques : *ompA* ou autres codant pour des protéines de structure de la membrane externe (Binns *et al.*, 1979; Taylor, 1988; Woolcock, 1988; Hancock et Piers, 1994).

Mise en évidence

La résistance à l'activité bactéricide du complément peut se démontrer par un test phénotypique de référence (Fierer *et al.*, 1972; Pohl *et al.*, 1992), qui consiste à ensemercer en tapis une gélose nutritive avec une culture de la souche à tester et à déposer une goutte de sérum frais provenant de l'espèce animale cible ou de diverses espèces animales. L'inhibition de la croissance bactérienne par le sérum est examinée après incubation de 24 heures à 37°C. Des tests d'inhibition de croissance en milieu liquide ont aussi été décrits (Borkowska-Opacka *et al.*, 1971; De Rycke *et al.*, 1982; Taylor et Kroll, 1983; Fairbrother *et al.*, 1989). Ces tests couvrent l'ensemble des mécanismes possibles de résistance, mais n'identifient pas le mécanisme impliqué. De plus, ils demandent une grande standardisation des réactifs.

A l'inverse, les tests génétiques sont spécifiques, mais ne couvrent pas tous les mécanismes possibles de résistance. Ils consistent en l'utilisation de sondes ou de PCR spécifiques des gènes *iss* (protéine *Iss*), *traT* (pro-

téine *TraT*) et *ompA* (protéine *OmpA*) (Bollmann *et al.*, 1997; Pfaff-McDonough *et al.*, 2000). Il n'y a pas à ce jour de publication comparant les résultats des tests phénotypiques et génétiques.

La résistance à la phagocytose (figure 2)

La propriété de phagocytose est en fait répandue dans l'ensemble du monde cellulaire. Cependant, toutes les cellules pratiquant la phagocytose des bactéries ne sont pas capables de les tuer. Seuls les phagocytes dits « professionnels » (polynucléaires neutrophiles et macrophages) sont, en principe, capables de tuer les bactéries phagocytées (Salyers et Whitt, 1994).

La réponse cellulaire initiale de l'organisme face à une invasion bactérienne est donc la suivante (Czuprynski, 1988; Salyers et Whitt, 1994):

- i) migration dirigée de phagocytes neutrophiles et macrophages d'origines locale et sanguine;
- ii) liaison avec les bactéries, après opsonisation éventuelle, et phagocytose;
- iii) stimulation du métabolisme oxydatif;
- iv) fusion phagosome/lysosome et mise en action des mécanismes tueurs des lysosomes;
- v) élimination des débris et déclenchement de la réponse immunitaire par présentation d'épitopes à la surface en combinaison avec les complexes majeurs d'histocompatibilité.

Les bactéries envahissantes peuvent se défendre contre la phagocytose en prévenant l'afflux de cellules phagocytaires, en évitant la phagocytose elle-même ou en échappant à la destruction après phagocytose soit par lyse du phagosome, soit par inhibition de la fusion avec les lysosomes, soit par résistance aux mécanismes de destruction des lysosomes (Czuprynski, 1988; Salyers et Whitt, 1994).

Les colibacilles invasifs n'étant pas des bactéries intracellulaires facultatives, elles ne pourraient survivre après ingestion par les cellules phagocytaires; il leur faut donc prévenir l'afflux de phagocytes ou la phagocytose. Le mécanisme le plus fréquent est la prévention de la phagocytose elle-même.

Les principales structures qui évitent aux colibacilles d'être ingérés par les cellules phagocytaires sont des polysaccharides de surface, présents dans certains antigènes capsulaires K et dans un moindre mesure somatiques O (Czuprynski, 1988; Whitfield *et al.*, 1994; Jann et Jann, 1997; Hull, 1997). L'hémolysine α pourrait aussi jouer un rôle anti-phagocytose par lyse cellulaire, à l'instar d'autres toxines RTX (*Mannheimia haemolytica*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*) (Welch, 1995; Ludwig et Goebel, 1997).

L'antigène K1, déjà cité, est le plus connu des antigènes protecteurs contre la phagocytose chez les colibacilles de l'homme et de la volaille (Czuprynski, 1988; Nataro et Levine, 1994; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999), mais certains autres antigènes K, qui sont fréquemment observés sur des souches invasives, pourraient l'être aussi: K5, K28, K29 chez l'homme; K79, K80, K"V165" chez le veau et le porcelet (Verweij-Van Vught *et al.*, 1984; Czuprynski, 1988; Fairbrother et Ngeleka, 1994; Gay et Besser, 1994).

En ce qui concerne les antigènes O, rien n'est connu avec certitude, bien que les souches invasives appartiennent à certains sérogroupes somatiques préférentiels (Gay et Besser, 1994; Fairbrother et Ngeleka, 1994; Nataro et Levine, 1994; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). Mais ces observations peuvent très bien avoir d'autres raisons et n'être que le reflet d'une association fortuite, utile quand on cherche un marqueur épidémiologique. Cependant, l'obtention de résultats contradictoires lors d'expériences *in vivo* et *in vitro* nécessite de nombreuses autres expériences pour déterminer les rôles respectifs des antigènes K et O dans la protection des colibacilles contre la phagocytose et l'importance de cette protection dans le développement de la maladie.

La prévention de la phagocytose n'est pas une propriété recherchée en routine lors de typage des colibacilles invasifs, au contraire de la résistance à l'activité bactéricide du complément. La réalisation d'un sérotypage (O:K:H) permet de mettre en évidence de manière indirecte l'existence d'une éventuelle propriété, lorsque l'antigène K1 est identifié par exemple. L'autre approche est génétique et fait appel à l'utilisation de sondes génétiques ou à la réalisation

Tableau 1 : Génétique, sécrétion, entrée et cibles des principales colicines produites par *E. coli*.

Colicine	Déterminisme génétique ^a	Mécanisme de sécrétion ^b	Mécanisme d'entrée ^c	Cible ^d
A	G1	G1	A	membrane
B	G2	G2	B	membrane
D	G1	G1	B	protéines
E1	G1	G1	A	membrane
E2	G1	G1	A	ADN
E3	G1	G1	A	ARN16S
E4	G1	G1	A	ARN16S
E5	G1	G1	A	ADN
E6	G1	G1	A	ARN16S
E7	G1	G1	A	ADN
E8	G1	G1	A	ADN
E9	G1	G1	A	ADN
Ia	G2	G2	B	membrane
Ib	G2	G2	B	membrane
K	G1	G1	A	membrane
M	G2	G2	B	PDG
N	G1	G1	A	membrane
V	G2	G2	B	membrane
X	G2	G2	A	ADN
Y	G1	?	B	membrane

^a G1 = gènes sur des plasmides de petite taille à haut nombre de copies ; G2 = gènes sur des plasmides de grande taille à bas nombre de copies

^b G1 = accumulation dans le cytoplasme suivie d'une quasi lyse bactérienne et de la libération des colicines ; G2 = mécanisme différent, mais non connu

^c A = franchissement de la membrane externe au travers de porines et voyage dans le périplasme par le système Tol ; B = franchissement de la membrane externe au travers d'un pore formé par le récepteur spécifique et voyage dans le périplasme par le système TonB

^d membrane = formation de pores dans la membrane cytoplasmique ; protéines = inhibition de la synthèse protéique ; ADN = clivage non spécifique de l'ADN, sauf ColX (bloquage de la réplication) ;

ARN16S = clivage spécifique de l'ARN ribosomal 16S ; PDG = inhibition de la synthèse du peptidoglycan

d'une PCR spécifiques des gènes qui codent pour l'antigène K1 (Bollmann *et al.*, 1997 ; Johnson et Stell, 2000 ; Moulin-Schouleur, communication personnelle).

La production de colicines (Col)

Les colicines font partie des bactériocines, un groupe hétérogène de toxines bactéricides produites par divers groupes de bactéries Gram négatives et Gram positives (Hardy, 1975 ; Tagg *et al.*, 1976 ; Konisky, 1982 ; Jack *et al.*, 1995). Au sens strict de la définition, les bactériocines sont des antibiotiques à spectre très étroit ne s'étendant, en règle générale, qu'aux souches de l'espèce productrice et de quelques espèces et

genres proches taxonomiquement (Sojka, 1965 ; Hardy, 1975 ; Lior, 1994 ; Lazdunski *et al.*, 1998), bien que ce théorème ait été remis récemment en question (Riley et Wertz, 2002). Les colicines sont les bactériocines produites par *E. coli*, ainsi que par quelques espèces et genres proches (Frédéricq, 1957).

La première publication sur une colicine remonte à 1925 par la mise en évidence d'un effet bactéricide sur certaines souches d'*E. coli* dans le surnageant de culture de la souche d'*E. coli* V pathogène pour le cobaye et le lapin (Gratia, 1925). Les travaux sur les colicines culmineront en 1953, avec la description de 17 groupes différents sur base de leur spectre d'acti-

tivité entre autres (Frédéricq, 1953) : ces groupes furent dénommés par les lettres A, B, E, I, V... en fonction des souches d'*E. coli* productrices sensibles ou résistantes. C'est ainsi que la colicine observée par Gratia (1925) et produite par *E. coli* V s'appelle colicine V (ColV). Actuellement, plus de 20 groupes de colicines ont été décrits et certains sont subdivisés : ColE1 à ColE9, ColIa et ColIb, par exemple (Konisky, 1982 ; Riley, 1998 ; Riley *et al.*, 2000). Pendant longtemps, un rôle a été attribué à certaines colicines dans la pathogénie des souches invasives d'*E. coli*, pour des raisons déjà abordées et qui vont être détaillées ci-après. Bien que cette hypothèse ait été infirmée depuis longtemps, il reste important d'en parler dans le cadre de cette synthèse pour des raisons historiques et moléculaires.

Description

Les colicines les mieux caractérisées sont des protéines formées d'une seule sous-unité d'un poids moléculaire variant entre 45 et 90 kDa (ColE1, ColIa, ColIb, ColK) comportant plusieurs domaines (activité, liaison au récepteur, liaison à la protéine d'immunité) ou de deux sous-unités d'un poids moléculaire de 50 kDa (domaine d'activité et de liaison au récepteur) et 10 kDa (liaison à la protéine d'immunité), respectivement (ColE2, ColE3). ColV est une exception, car plus petite avec un poids moléculaire de seulement 10 kDa. Une même souche peut produire plus d'une colicine (Frédéricq, 1957 ; Konisky, 1982 ; Havarstein *et al.*, 1994 ; Riley, 1998 ; Riley et Wertz, 2002).

Activités (tableau 1)

Pour exercer leur activité, les colicines doivent franchir les membranes des bactéries cibles. Les mécanismes exacts ne sont pas connus pour toutes les colicines, mais peuvent se résumer comme suit. La première étape est la fixation sur un récepteur présent à hauteur de la membrane externe via un domaine particulier de la protéine ou de la sous-unité de 50 kDa (Konisky, 1982). Ces récepteurs sont des protéines ou glycoprotéines à fonction de porines ou servant de récepteurs à des vitamines, des sidérophores (FepA), des phages... Chaque récepteur est spécifique

d'une ou quelques colicines (Frédéricq, 1953; 1957; Hardy, 1975; Konisky, 1982; Pugsley, 1984a; Benedetti *et al.*, 1991; Lazdunski *et al.*, 1998). En fonction du type de récepteur, les colicines franchissent la membrane externe au travers de porines (comme OmpA, OmpC, OmpF, etc) et voyagent dans le périplasme en parasitant le système Tol (**TOLerant**) (groupe A: A, E1 à E9, K, L, N...), ou bien franchissent la membrane externe au travers d'un canal formé par le récepteur lui-même et voyagent dans le périplasme en parasitant le système TonB (colicines du groupe B: B, D, Ia, Ib, M, V...) déjà impliqué dans le transport de l'entérobactine. Les colicines atteignent ainsi la membrane cytoplasmique à hauteur de laquelle elles exercent leur action, ou qu'elles franchissent à son tour, toujours grâce aux systèmes Tol ou TonB, pour atteindre le cytoplasme bactérien (Pugsley, 1984a; Lazdunski *et al.*, 1998).

Les colicines se subdivisent en divers groupes en fonction de leur mécanisme d'action: création de pores à hauteur de la membrane cytoplasmique (ColA, ColE1, ColIa, ColIb, ColK, ColV), clivage enzymatique non spécifique de l'ADN (ColE2, ColE5, ColE7, ColE8, ColE9) ou spécifique de l'ARN ribosomal 16S (ColE3, ColE4, ColE6), inhibition de la synthèse protéique (ColD) ou du peptidoglycan (ColM) (Hardy, 1975; Konisky, 1982; Pugsley, 1984a; Benedetti *et al.*, 1991; Lazdunski *et al.*, 1998; Riley, 1998).

Si les souches cibles peuvent devenir résistantes à l'action d'une colicine par mutation dans le gène qui code pour le récepteur, les souches productrices sont protégées par un système dit d'immunité. Ce terme provient de la confusion qui existait, à l'origine, entre colicines et bactériophages (Frédéricq, 1953; 1957). Le mécanisme de protection est conféré par une protéine qui se lie spécifiquement et sur une base stoechiométrique à un domaine de la protéine ou de la sous-unité de 10 kDa et inactive la toxicité de la colicine. Cette liaison se fait dans le cytoplasme bactérien. Des clones ne renfermant pas le gène qui code pour cette protéine d'immunité ne sont pas viables. Cette protection est relative, car de fortes concentrations de colicines peuvent tuer des cellules bactériennes normalement immunes (Hardy, 1975; Konisky,

1982; Pugsley, 1984b; Benedetti *et al.*, 1991).

Rôle en pathologie

Les premiers résultats publiés sur les colicines montraient que leur production était importante parmi les souches pathogènes, tout spécialement les souches invasives d'*E. coli*. La souche étudiée initialement par Gratia (1925) était appelée souche *E. coli* V, pour « Virulence ». Le nom ColV reste dans l'esprit de nombreuses personnes synonyme de virulence d'ailleurs ! Il était donc logique qu'un rôle soit proposé pour ces colicines dans la virulence des colibacilles producteurs (Hardy, 1975).

Certains résultats expérimentaux abondèrent d'ailleurs en ce sens en montrant : (i) que les souches de colibacilles productrices de ColV étaient plus létales chez le porcelet et la souris, en injection parentérale, que les souches mutantes non productrices; et (ii) que des souches de laboratoire ayant acquis le plasmide ColV devenaient, dans ces modèles, aussi létales que les souches sauvages d'origine. A l'opposé, l'acquisition de la production de ColE1, Ia ou Ib n'avait aucune conséquence dans ces mêmes tests (Smith, 1974; 1978; Ozanne *et al.*, 1977; Smith et Huggins, 1976; 1980).

Aujourd'hui, cependant, aucun rôle pathogène n'est plus attribué à ColV, ni à une autre colicine dans la virulence des colibacilles et particulièrement dans leur effet toxique sur l'hôte. Diverses expériences de mutation et de clonage des gènes codant pour ColV ont permis d'arriver à cette conclusion (Crosa, 1984). Les propriétés observées *in vivo* (Smith, 1974; 1978; Ozanne *et al.*, 1977) sont en fait dues à d'autres propriétés de ces souches, codées par des gènes co-localisés sur le plasmide ColV: production d'aérobactine et/ou résistance à l'activité bactéricide du complément. Quant aux souches mutantes testées (Smith, 1974; 1978; Smith et Huggins, 1976; 1980; Ozanne *et al.*, 1977), elles avaient en réalité perdu le plasmide ColV dans son entièreté (Lior, 1994).

Si les colicines ne jouent pas de rôle direct en pathologie, pourraient-elles jouer un rôle indirect en augmentant le pouvoir de colonisation et la survie des souches productrices par action sur les souches colibacillaires com-

mensales de l'intestin (Luria et Suit, 1987) ?

Il est aujourd'hui encore difficile de répondre clairement à cette question, d'une part, parce que les expériences *in vivo* dans ce domaine sont peu nombreuses (Hardy, 1975; Bettelheim, 1997), d'autre part, parce que les résultats d'expériences *in vitro* et *in vivo* sur les antagonismes bactériens sont souvent contradictoires (Freter, 1988). De plus, ces expériences ne comprennent jusqu'à présent pas de tests menés avec des mutants obtenus par échange allélique.

En résumé, le rôle direct des colicines dans la virulence bactérienne est actuellement considéré comme inexistant. S'il est évident que les colicines sont des moyens (violents !) de dialogues entre cellules bactériennes dans leur environnement, leur rôle exact, dans la nature ou chez un hôte supérieur, reste inconnu.

De plus, la production d'une colicine V ou I ne constitue, aujourd'hui, même plus un marqueur épidémiologique pour les souches invasives humaines et animales, particulièrement les souches nécrotogènes (Hardy, 1975; Lior, 1994; Mainil, 1993; Oswald *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992; Mainil *et al.*, 1999; 2001); par contre, celle d'une colicine D par des souches entérohémorragiques O157:H7 pourrait l'être (Beutin, 2000).

Déterminisme génétique et sécrétion (tableau 1)

Les colicines sont codées par des gènes localisés soit sur des plasmides de petite taille et à haut nombre de copies par cellule bactérienne (colicines du groupe 1), soit sur des plasmides de grande taille et à bas nombre de copies par cellule bactérienne (colicines du groupe 2) (Hardy, 1975; Pugsley, 1984a; Luria et Suit, 1987; Riley, 1998; Riley *et al.*, 2000; Riley et Wertz, 2002).

Le gène de structure d'une colicine est associé sur le plasmide à deux ou trois autres gènes, dont l'un code pour la protéine impliquée dans l'immunité et le, ou les deux autres, pour des protéines intervenant dans le processus de sécrétion. Le processus de sécrétion est indépendant de la présence d'une séquence signal et du système *sec* et se fait en conjonction avec la protéine TolC présente dans la

membrane externe (Pugsley, 1984a; Gilson *et al.*, 1987; Luria et Suit, 1987; Havarstein *et al.*, 1994; Zhang *et al.*, 1995; Riley, 1998).

Lors de leur synthèse, les colicines du groupe 1 (A, D, E1 à E7, K, N) s'accumulent rapidement en grandes quantités dans le cytoplasme bactérien, liées à la protéine d'immunité. Leur sécrétion s'accompagne d'une quasi-lyse membranaire par formation d'un canal au travers de la membrane et par activation de phospholipases, sous l'action de la protéine sécrétrice, avec relargage de différentes protéines cytoplasmiques et périplasmiques et mort cellulaire. Cette mort cellulaire est un paradoxe de la production de ces colicines du point de vue de la cellule productrice, mais peut-être pas de la population. Les colicines du groupe 2 (B, Ia, Ib, M, V, X) sont synthétisées moins rapidement et leur processus de sécrétion est moins bien caractérisé (Pugsley, 1984a; James *et al.*, 1996; Riley et Wertz, 2002).

L'expression de ces opérons est sous la dépendance de conditions extérieures diverses : phase de croissance, présence de toxique, concentration en ions fer (via le système Fur), état d'anaérobiose, température et/ou osmolarité. La synthèse des colicines (sauf ColV et ColX) est aussi régulée par le système SOS qui est normalement induit lors de stress subis par la bactérie, dont par exemple des dommages à l'ADN (Pugsley, 1984a; James *et al.*, 1996; Boyer et Tai, 1998; Kuhar et Zgur-Bertok, 1999; Riley et Wertz, 2002).

Mise en évidence

La grande diversité des colicines fait que leur mise en évidence est basée avant tout sur les tests phénotypiques classiques (Frédéricq, 1957). Ces tests permettent la mise en évidence de la production d'une colicine en général et son identification par l'utilisation d'une souche résistante spécifique. Il ne faut cependant pas oublier qu'une même souche de colibacille peut produire diverses colicines.

Les souches à tester sont ensemencées en spot sur une gélose nutritive et tuées par des vapeurs de chloroforme après une culture de nuit. Des cultures de souches sensibles et résistantes de référence sont ensemencées dans la masse d'une seconde couche de gélose, qui est coulée sur la pre-

mière. Après une nouvelle croissance de nuit, on constate la présence ou l'absence de zones d'inhibition des souches de référence (Frédéricq, 1957; Oswald *et al.*, 1991; Pohl *et al.*, 1992). Ces tests peuvent être adaptés à une détermination quantitative de la production de colicines par dilution successive en milieu liquide ou solide (Havarstein *et al.*, 1994).

Pour certaines colicines (ColV par exemple), l'utilisation de sondes génétiques et de PCR spécifiques a aussi été mise au point (Linggood *et al.*, 1987; Fernandez-Beros *et al.*, 1990; Dozois *et al.*, 2000; Johnson et Stell, 2000; Pfaff-Mc Donough *et al.*, 2000).

REMERCIEMENTS

Les travaux réalisés sur les souches invasives ont bénéficié de l'appui financier de la Commission Européenne (Action à frais partagés FAIR3-CT96-1335) de 1997 à 1999 et de la DGVI du Ministère fédéral de l'Agriculture (Convention de Recherches 5936) en 2000/2001.

Virulence factors and specific properties of invasive *Escherichia coli* :

II) Mucosal transfer and invasive properties

SUMMARY

Escherichia coli bacterial species is subdivided into several strains that are pathogenic for man and animals, on the basis of their specific properties and factors which are responsible for their pathogenic characters. The pathogenic strains are classically subdivided into strains with intestinal tropism (enterotoxigenic, enteropathogenic, enterohaemorrhagic, verotoxigenic and enteroinvasive) and with extraintestinal tropism (uropathogenic and invasive). Invasive strains cause septicaemia and/or bacteraemia with localisations in different internal

organs (systemic infections). If specific virulence properties and factors of strains with intestinal tropism are quite well known and described, those of strains with extraintestinal tropism are much less characterised, especially in animals.

The purpose of this serie of review articles is to present the current knowledge on specific properties and factors of extraintestinal strains : adhesins and colonisation factors, transmucosal transfer and survival in blood and internal organs, toxicity. The fourth manuscript will deal with the invasive strains themselves, focusing on the necrotoxigenic strains.

This second manuscript presents the current knowledge on the transmucosal transfer, resistance to the bactericidal activity of the complement, resistance to phagocytosis and production of colicins, that were, for several years, considered as an important specific property of invasive strains of *E. coli*.

BIBLIOGRAPHIE

- BENEDETTI H., FRENETTE M., BATY D., KNIBIEHLER M., PATTUS F., LAZDUNSKI C. Individual domains of colicins confer specificity in colicin uptake, in pore-properties and in immunity requirement. *J. Mol. Biol.*, 1991, **217**, 429-439.
- BETTELHEIM K.A. *Escherichia coli* in the normal flora of humans and animals. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 85-110.
- BEUTIN L. *Escherichia coli* as a pathogen in dogs and cats. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 285-298.
- BEUTIN L. Plasmids in VTEC : their role in virulence and their use in typing. In : Duffy G., Garvey P., Coia J., Wasteson Y., Mc Dowell D.A. (Eds), *Verocytotoxigenic Escherichia coli in Europe. 3. Pathogenicity and Virulence (Proceedings)*. Concerted Action CT98-3935, The National Food Centre : Dublin, 2000, 126-139.
- BINNS M.M., DAVIS D.L., HARDY K.G. Cloned fragments of the plasmid Col V, I - K94. *Nature*, 1979, **279**, 778-781.
- BOLLMANN R., SEEBURG A., PARSCHAU J., SCHONIAN G., SOKOLOWSKA-KOHLER W., HALLE E., PRESBER W. Genotypic and phenotypic determination of five virulence markers in clinical isolates of *Escherichia coli*. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1997, **17**, 263-271.
- BORKOWSKA-OPACKA B. Bactericidal action of swine against strains of *Escherichia coli*. I. Resistance of various serotypes to serum action. *Bull. Vet. Inst. Pulawy*, 1971, **15**, 73-88.
- BOYER A.E., TAI P.C. Characterization of the *cvaA* and *cvi* promoters of the colicin V export system: iron-dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 1662-1672.
- BRAUN V. The unusual features of the iron transport systems of *Escherichia coli*. *TIBS*, 1985, **10**, 75-78.
- BROT N., GOODWIN J. Regulation of 2,3-dihydroxybenzoylserine synthetase by iron. *J. Biol. Chem.*, 1968, **243**, 510-513.
- CARBONETTI N.H., WILLIAMS P.M. A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid Col V - K30. *Infect. Immun.*, 1984, **46**, 7-12.
- CARBONETTI N.H., WILLIAMS P.M. Detection of synthesis of the hydroxamate siderophore aerobactin by pathogenic isolates of *Escherichia coli*. In : Sussman M. (Ed.), *The virulence of Escherichia coli: reviews and techniques*. Special Publication of the Society for General Microbiology, Academic Press : London, 1985, 419-424.
- CARBONETTI N.H., BOONCHAI S., PARRY S.H., VAI-SANEN-RHAN V., KORHANEN T.K., WILLIAMS P.H. Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infect. Immun.*, 1986, **51**, 966-968.
- CARNIEL E., GUIYOULE A., GUILVOUT I., MERCE-REAU-PIUJALON O. Molecular cloning, iron-regulation and mutagenesis of the *irp2* gene encoding HMWP2, a protein specific for the highly pathogenic *Yersinia*. *Mol. Microbiol.*, 1992, **6**, 379-388.
- CROSA J.H. The relationship of plasmid-mediated iron transport and bacterial virulence. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1984, **38**, 69-89.
- CZIROK E., DHO M., HERPAY M., GADO I., MILCH H. Association of virulence markers with animal pathogenicity of *Escherichia coli* in different models. *Acta Microbiol. Hung.*, 1990, **37**, 207-217.
- CZUPRYNSKI C.J. Bacterial evasion of cellular defense mechanisms: an overview. In : Roth J.A. (Ed.), *Virulence mechanisms of bacterial pathogens*. ASM Press : Washington, D.C., 1988, 141-160.
- DE RYCKE J., BOIVIN R., LE ROUX PH. Mise en évidence de souches d'*Escherichia coli* à caractère septicémique dans les fèces de veaux atteints d'entérite mucoïde. *Ann. Rech. Vét.*, 1982, **13**, 385-397.
- DHO-MOULIN M., FAIRBROTHER J.M. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet. Res.*, 1999, **30**, 299-316.
- DONNENBERG M.S., WELCH R.A. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In : Mobley H.L.T., Warren J.W. (Eds), *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press : Washington D.C., 1996, 135-174.
- DOZOIS C.M., DHO-MOULIN M., BREE A., FAIRBROTHER J.M., DESAUTELS C., CURTISS III R. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 4145-4154.
- FAIRBROTHER J.M. Les colibacilloses du porc. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 369-375.
- FAIRBROTHER J.M., NGELEKA M. Extraintestinal *Escherichia coli* infection in pigs. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli in domestic animals and humans*. CAB International : Wallingford, 1994, 221-236.
- FAIRBROTHER J.M., BROES A., JACQUES M., LARIVIERE S. Pathogenicity of *Escherichia coli* O115:K"V165" strains isolated from pigs with diarrhea. *Am. J. Vet. Res.*, 1989, **50**, 1029-1036.
- FERNANDEZ-BEROS M.E., KISSEL V., LIOR H., CABELLO F.C. Virulence-related genes in Col V plasmids of *Escherichia coli* isolated from human blood and intestines. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 742-746.
- FIERER J., FINLAY F., BRAUNE A.I. A plaque assay on agar for detection of Gram-negative bacilli sensitive to complement. *J. Immunol.*, 1972, **109**, 1156-1158.
- FREDERICQ P. Colicines et bactériophages. *Ann. Inst. Pasteur*, 1953, **84**, 294-312.
- FREDERICQ P. Colicins. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1957, **11**, 7-22.

- FRETER R. Mechanisms of bacterial colonization of the mucosal surfaces of the gut. In : Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press : Washington, D.C., 1988, 45-60.
- GAY C.C., BESSER T.E. *Escherichia coli* septicaemia in calves. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 75-90.
- GIBSON F., MAGRATH D.I. The isolation and characterization of a hydroxamic acid (aerobactin) formed by *Aerobacter aerogenes* 62.1. *Biochim. Biophys. Acta*, 1969, **192**, 175-184.
- GILSON L., MAHANTY H.K., KOLTER R. Four plasmid genes are required for Colicin V synthesis, export and immunity. *J. Bacteriol.*, 1987, **169**, 2466-2470.
- GOPHNA U., OELSCHLAEGER T.A., HACKER J., RON E.Z. *Yersinia* HPI in septicemic *Escherichia coli* strains isolated from diverse hosts. *FEMS Microbiol. Letters*, 2001, **196**, 57-60.
- GRATIA A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *C.R. Soc. Biol. Paris*, 1925, **93**, 1040-1041.
- GRIFFITHS E. Iron acquisition systems in *Escherichia coli*. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 533-566.
- GRIFFITHS E. Iron and the virulence of *Escherichia coli*. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 331-371.
- GRIFFITHS E., HUMPHREYS J. Isolation of enterocholin from the peritoneal washings of guinea-pigs lethally infected with *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1980, **28**, 286-289.
- GRIFFITHS E., CHART H., STEVENSON P. High-affinity iron uptake systems and bacterial virulence. In : Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press : Washington, D.C., 1988, 121-137.
- GUERINOT M.L. Microbial iron transport. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1994, **48**, 743-772.
- HANCOCK R.E.W., PIERS K. Outer membrane proteins. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 495-532.
- HARDY K.G. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriol. Rev.*, 1975, **39**, 464-515.
- HAREL J., MARTIN C. Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*. *Vet. Res.*, 1999, **30**, 131-156.
- HAVARSTEIN L.S., HOLO H., NES I.F. The leader peptide of colicin V shares consensus sequences with leader peptides that are common among peptide bacteriocins produced by Gram-positive bacteria. *Microbiol.*, 1994, **140**, 2383-2389.
- HIRSCH D.C., KIRKHAM C., WILSON W.D. Linkage of serum resistance, aerobactin production, and resistance to microbial agents on conjugal plasmids in some strains of *Escherichia coli* isolated from septic foals. *Am. J. Vet. Res.*, 1993, **54**, 878-881.
- HULL S. *Escherichia coli* lipopolysaccharide in pathogenesis and virulence. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 145-167.
- JACK R.W., TAGG J.R., RAY B. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Microbiol. Rev.*, 1995, **59**, 171-200.
- JAMES R., KLEANTHOUS C., MOORE G.R. The biology of E colicins : paradigms and paradoxes. *Microbiol.*, 1996, **142**, 1569-1580.
- JANN K., JANN B. Capsules of *Escherichia coli*. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 113-143.
- JANSSEN T., SCHWARZ C., PREIKSCHAT P., VOSS M., PHILIPP H.-C., WIELER L. Virulence-associated genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis. *Int. J. Med. Microbiol.*, 2001, **291**, 371-378.
- JOHNSON J.R. Urinary tract infection. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 495-549.
- JOHNSON J.R., STELL A.L. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J. Infect. Dis.*, 2000, **181**, 261-272.
- KARCH H., SCHUBERT S., ZHANG D., ZHANG W., SCHMIDT H., OELSCHLAEGER T., HACKER J. A genomic island, termed « High-pathogenicity island », is present in certain non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* clonal lineages. *Infect. Immun.* 1999, **67**, 5994-6001.
- KONISKY J. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Annu. Rev. Microbiol.*, 1982, **36**, 125-144.
- KORTH M.J., LARA J.C., MOSELEY S.L. Epithelial cell invasion by bovine septicemic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1994, **62**, 41-47.
- KUHAR I., ZGUR-BERTOK D. Transcription regulation of the colicin K *cka* gene reveals induction of colicin synthesis by differential responses to environmental signals. *J. Bacteriol.*, 1999, **181**, 7373-7380.
- LAZDUNSKI C.J., BOUVERET E., RIGAL A., JOURNET L., LLOUBES R., BENEDETTI H. Colicin import into *Escherichia coli* cells. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 4993-5002.
- LINGGOOD M.A., ROBERTS M., FORD S., PIERRY S.H., WILLIAMS P.H. Incidence of the aerobactin iron uptake system among *Escherichia coli* isolates from infections of farm animals. *J. Gen. Microbiol.*, 1987, **133**, 835-842.
- LIOR H. Classification of *Escherichia coli*. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 31-72.
- LUDWIG A., GOEBEL W. Haemolysins of *Escherichia coli*. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mecha-

- nisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 281-329.
- LURIA S.E., SUIT J.L. Colicins and Col plasmids. In: Ingraham J.L., Low K.B., Magasanik B., Schaechter M., Umbarer H.E. (Eds), *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium* cellular and molecular biology. ASM Press: Washington D.C., 1987, 1615-1624.
- MAINIL J. Les colibacillooses dans l'espèce bovine. *Ann. Méd. Vét.*, 1993, **137**, 343-350.
- MAINIL J., JACQUEMIN E., POHL P., FAIRBROTHER J.M., ANSUINI A., LE BOUGUENEC C., BALL H.J., DE RYCKE J., OSWALD E. Comparison of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolates from farm animals and from humans. *Vet. Microbiol.*, 1999, **70**, 123-135.
- MAINIL J., WILBAUX M., JACQUEMIN E., OSWALD E., IMBERECHTS H., VAN BOST S. Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* chez les chiens et les chats : III) Données bactériologiques et cliniques sur les souches nécrotoxigènes et sur celles positives pour des adhésines. *Ann. Méd. Vét.*, 2001, **145**, 343-354.
- MAC LAREN D.M. Soft tissue infection and septicaemia. In : Sussman M. (Ed.), *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. Cambridge University Press : Cambridge, 1997, 469-494.
- NATARO J.P., LEVINE M.M. *Escherichia coli* diseases in humans. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 285-333.
- NGELEKA M., HAREL J., JACQUES M., FAIRBROTHER J.M. Characterization of a polysaccharide capsular antigen of septicemic *Escherichia coli* O115:K'V165':F165 and evaluation of its role in pathogenicity. *Infect. Immun.*, 1992, **60**, 5048-5056.
- O'BRIEN A.D., GIBSON F. The structure of enterocholin and related 2,3-dihydroxy N-benzoylserine conjugate from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1970, **215**, 393-402.
- OSWALD E., DE RYCKE J., LINTERMANS P., VAN MUYLEM K., MAINIL J., DAUBE G., POHL P. Virulence factors associated with cytotoxic necrotizing factor type 2 in bovine diarrheic and septicemic strains of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1991, **29**, 2522-2527.
- OZANNE G., MATHIEU L.G., BARIL J.P. Production of Colicin V *in vitro* and *in vivo* and observations on its effects in experimental animals. *Infect. Immun.*, 1977, **17**, 497-503.
- PELLUDAT C., RAKIN A., JACOBI C.A., SCHUBERT S., HEESEMANN J. The Yersiniabactin biosynthetic gene cluster of *Yersinia enterocolitica* : organization and siderophore-dependant regulation. *J. Bacteriol.*, 1998, **180**, 538-546.
- PERNA N.T., GLASNER J.D., BURLAND V., PLUNKETT III G. The genomes of *Escherichia coli* K-12 and pathogenic *E. coli*. In : Donnenberg M.S. (Ed.), *Escherichia coli* : virulence mechanisms of a versatile pathogen. Academic Press : London, 2002, 3-54.
- PFAFF-Mc DONOUGH S.J., HORNE S.M., GIDDINGS C.W., EBERT J.O., DOETKOTT C., SMITH M.H., NOLAN L.K. Complement resistance-related traits among *Escherichia coli* isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis. *Avian Dis.*, 2000, **44**, 23-33.
- POHL P., DAUBE G., MAINIL J., LINTERMANS P., KAECKENBEECK A., OSWALD E. Facteurs de virulence et phénotypes de soixante et une souches d'*Escherichia coli* d'origine bovine, productrices de la toxine cytotoxique nécrosante de type 1 (CNF1). *Ann. Rech. Vét.*, 1992, **23**, 83-91.
- PUGSLEY A.P. The ins and outs of colicins. Part I : Production, and translocation across membranes. *Microbiol. Science*, 1984a, **1**, 168-175.
- PUGSLEY A.P. The ins and outs of colicins. Part II : Lethal action, immunity and ecological implications. *Microbiol. Science*, 1984b, **1**, 203-205.
- RATLEDGE C., DOVER L.G. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2000, **54**, 881-941.
- RIDLEY A.J. Rho : theme and variations. *Curr. Biol.*, 1996, **6**, 1256-1264.
- RILEY M.A. Molecular mechanisms of bacteriocin evolution. *Annu. Rev. Genet.*, 1998, **32**, 255-278.
- RILEY M.A., WERTZ J.E. Bacteriocins : evolution, ecology, and application. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2002, **56**, 117-138.
- RILEY M.A., CADAVID L., COLLETT M.S., NEELY M.N., ADAMS M.D., PHILLIPS C.M., NEEL J.V., FRIEDMAN D. The newly characterized colicin Y provides evidence of positive selection in pore-former colicin diversification. *Microbiol.*, 2000, **146**, 1671-1677.
- ROANTREE R.J., RANTZ L.A. A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection. *J. Clin. Invest.*, 1960, **39**, 72-81.
- ROBERTS M., WOOLDRIDGE K.G., GARINE H., KUSSWANDI S., WILLIAMS P.H. Inhibition of biological activities of the aerobactin receptor protein in rough strains of *Escherichia coli* by polyclonal antiserum raised against native protein. *J. Gen. Microbiol.*, 1989, **135**, 2387-2398.
- ROWLEY D. Some factors affecting the resistance of animals to bacterial infection. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1956, **66**, 304-311.
- RUSSO T.A. Capsule and lippopolysaccharide. In : Donnenberg M.S. (Ed.), *Escherichia coli* : virulence mechanisms of a versatile pathogen. Academic Press : London, 2002, 379-404.
- SALYERS A.A., WHITT D.D. Bacterial pathogenesis : a molecular approach. ASM Press : Washington, D.C., 1994, 1-418.
- SALYERS A.A., WHITT D.D. Bacterial pathogenesis : a molecular approach. 2nd Edition. ASM Press : Washington, D.C., 2002, 1-539.
- SCHOCH C., LEBEK G. Nachweis von plasmidisch kodierten Eisen-Transportmechanismen in Enterobacteriaceae. *Hyg. Med.*, 1984, **9**, 409-412.

- SCHUBERT S., RAKIN A., KARCH H., CARNIEL E., HEESEMANN J. Prevalence of the «High-pathogenicity island» of *Yersinia* species among *Escherichia coli* strains that are pathogenic to humans. *Infect. Immun.*, 1998, **66**, 480-485.
- SCHUBERT S., PICARD B., GOURIOU S., HEESEMANN J., DENAMUR E. *Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extra-intestinal infections. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5335-5337.
- SMITH H.W. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli* : the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with Colicin V. *J. Gen. Microbiol.*, 1974, **83**, 95-111.
- SMITH H.W. Transmissible pathogenic characteristics of invasive strains of *Escherichia coli*. *JAVMA*, 1978, **173**, 601-607.
- SMITH H.W., HUGGINS M.B. Further observations on the association of the colicine V plasmid of *Escherichia coli* with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. *J. Gen. Microbiol.*, 1976, **92**, 335-350.
- SMITH H.W., HUGGINS M.B. The association of the O18, K1 and H7 antigens and the Col V plasmid of a strain of *Escherichia coli* with its virulence and immunogenicity. *J. Gen. Microbiol.*, 1980, **121**, 387-400.
- SOJKA W.J. *Escherichia coli* in domestic animals and poultry. Part I : General characteristics and biochemical behaviour of *Escherichia coli*. 4. Other properties : Colicins. Commonwealth Agricultural Bureaux : Farnham Royal, 1965, 56-57.
- TAGG J.R., DAJANI A.S., WANNAWAKER L.W. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 1976, **40**, 722-756.
- TAYLOR P.W. Bacterial resistance to complement. In : Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press : Washington, D.C., 1988, 107-120.
- TAYLOR P.W., KROLL H.P. Killing of an encapsulated strain of *Escherichia coli* by human serum. *Infect. Immun.*, 1983, **39**, 122-131.
- VERWEIJ-VAN VUGHT A.M.J.J., NAMAVAR F., PEERBOOMS P.G.H., SPARRIUS M., MAC LAREN D.M. The role of different K antigens of *Escherichia coli* in phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes. *J. Med. Microbiol.*, 1984, **17**, 141-150.
- WELCH R.A. Phylogenetic analyses of the RTX family. In : Roth J.A., Bolin C.A., Brogden K.A., Minion F.C., Wannemuehler M.J. (Eds), Virulence mechanisms of bacterial pathogens (2^{ème} édition). ASM Press : Washington, D.C., 1995, 195-206.
- WHITFIELD C., KENLEYSIDE W.J., CLARKE B.R. Structure, function and synthesis of surface polysaccharides in *Escherichia coli*. In : Gyles C.L. (Ed.), *Escherichia coli* in domestic animals and humans. CAB International : Wallingford, 1994, 437-494.
- WILLIAMS P.H. Novel iron uptake system specified by Col V plasmids : an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, 1979, **26**, 925-932.
- WOOLCOCK J.B. Bacterial resistance to humoral defense mechanisms : an overview. In : Roth J.A. (Ed.), Virulence mechanisms of bacterial pathogens. ASM Press : Washington, D.C., 1988, 73-93.
- YAMAMOTO S., TERAJ A., YURI K., KURAZONO H., TAKEDA Y., YOSHIDA O. Detection of urovirulence factors in *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 1995, **12**, 85-90.
- ZHANG L.H., FATH M.J., MAHANTY H.K., TAI P.C., KOLTER R. Genetic analysis of the colicin V secretion pathway. *Genetics*, 1995, **141**, 25-32.