

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

Orientation : Médecine vétérinaire

Titre de la thèse en Français: Les souches nécrotoxigènes d'*Escherichia coli* : étude du rôle de la toxine CNF2 et de la toxine CDT-III dans un modèle expérimental d'infection chez le veau

Titre de la thèse en Anglais: Necrotoxicogenic *Escherichia coli* : study of the roles of CNF2 and CDT-III toxins in an experimental model of infection in calves

Candidat : Sigrid Van Bost

Promoteur : Prof. Jacques Mainil

Département et Service: Département des Maladies infectieuses et parasitaires, Service de Bactériologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique

Date de la défense publique : 2 septembre 2004

Composition du Jury :

Membres internes à la Faculté de Médecine vétérinaire : B. China, F. Coignoul, G. Daube, J. Mainil, B. Nicks, F. Rollin, E. Thiry.

Membres externes à la Faculté de Médecine vétérinaire : P. Demol (Faculté de Médecine, Université de Liège), F. Haesebrouck (Université de Gand), P. Pohl.

DESCRIPTION DU SUJET

DE RECHERCHE ABORDÉ

Les *Escherichia coli* nécrotoxigènes (NTEC) sont caractérisées par la production d'une toxine, le facteur cytotoxique nécrosant (CNF), capable de provoquer la formation de cellules géantes multinucléées lorsqu'elle est administrée à des cellules HeLa en culture et de la nécrose lorsqu'elle est injectée sous la peau de lapin. Deux différents types de CNF sont connus à l'heure actuelle : CNF1, dont le gène est situé sur le chromosome, et CNF2, dont le gène est situé sur un plasmide, nommé Vir. Les souches d'*Escherichia coli* qui les produisent ont été appelées NTEC1 et NTEC2, respectivement. Les souches NTEC2 ont été mises en évidence dans des pathologies très diverses des ruminants : infections du tractus gastro-intestinal, pneumonies, septicémies, métrites, mammites, avortements, mais elles ont également été isolées de bovins sains.

In vitro, l'interaction de cellules HeLa avec une souche NTEC2 provoque l'apparition d'un effet cytopathique caractérisé par un élargissement des cellules, un arrêt du cycle cellulaire en phase G2/M et la formation de fibres de stress. Dans ce modèle, la réorganisation du cytosquelette d'actine traduit par la formation des fibres de stress est dû à la toxine CNF2 alors que l'arrêt du cycle cellulaire est dû à un membre de la famille des toxines cytoléthales distendant, CDT-III dont l'opéron, constitué des trois gènes *cdt-A*, *cdt-B* et *cdt-C*, est situé sur le plasmide Vir également.

In vivo, dans les années septante, un veau a été inoculé avec une souche NTEC2 ovine. Celle-ci a provoqué la mort de l'animal après apparition de symptômes nerveux. La souche inoculée a été mise en évidence dans le sang et les organes internes de l'animal. Depuis lors, aucune expérience n'a été réalisée en vue de confirmer les effets des souches NTEC2

dans les pathologies des ruminants et d'étudier les rôles des toxines CNF2 et CDT-III.

RÉSULTATS

Dans la première étude, onze veaux colostrum-restreints ont été inoculés oralement à l'âge de six heures avec deux souches NTEC2. La première souche (1404 ; sérotype O78:K80:H-:F17) avait été isolée du sang d'un veau septicémique. La deuxième souche (B20a ; sérotype O15:K14:H-:F17) avait été isolée des matières fécales d'un veau diarrhéique. Tous ces veaux ont présenté une diarrhée liquide et abondante qui a persisté jusqu'au moment de l'euthanasie chez huit d'entre-eux. Chez ces huit veaux, la présence de la diarrhée était en corrélation avec l'excrétion fécale de la souche inoculée. A l'autopsie, les lésions présentes étaient une congestion vasculaire de la muqueuse intestinale accompagnée d'une hypertrophie des ganglions mésentériques associés. Une analyse bactériologique a permis de confirmer la colonisation intestinale ainsi que de constater la présence de la souche inoculée dans le sang du cœur, le foie et/ou les poumons de ces veaux. Les lésions histologiques étaient celles d'une entéocolite accompagnée d'une lymphadénite et d'une bronchopneumonie limitée.

Quatre veaux ont été inoculés de la même façon avec une souche considérée comme non-pathogène (H209) dans laquelle a été introduit le plasmide Vir de la souche 1404. Ces inoculations ont résulté en l'apparition d'une diarrhée, de lésions intestinales et d'invasion identiques à celles rencontrées chez les veaux inoculés avec la souche sauvage. Dans le but d'analyser les rôles respectifs de la toxine CNF2 et de la toxine CDT-III, des veaux ont été inoculés avec les mutants isogéniques $\Delta cnf2$ et $\Delta cdt-III A$ de la souche 1404 (aimablement reçus du Dr Eric Oswald de l'Unité INRA-associée de Microbiologie moléculaire de l'Ecole National Vétérinaire de Toulouse, France). Trois des quatre veaux inoculés avec la souche 1404 $\Delta cnf2$ n'ont présenté aucun symptôme clinique particulier malgré une colonisation intestinale réussie ainsi que l'atteste la présence de la souche inoculée dans les matières fécales jusqu'au moment de l'euthanasie et dans le contenu intestinal à l'autopsie. La souche mutante était cependant toujours capable d'envahir l'organisme et d'atteindre les organes internes de ces veaux. Les veaux inoculés avec la souche 1404 $\Delta cdt-III A$ ont évolué de la même façon que les veaux inoculés avec la souche sauvage en ce qui concerne les signes cliniques, la colonisation intestinale, les lésions macroscopiques et les lésions microscopiques.

Ce travail a également démontré l'existence des souches NTEC1 et NTEC2 parmi des collections de colibacilles isolés de veaux diarrhéiques et septicémiques, dans les années 1960 et 1970. A côté des toxines CNF1 et CNF2, d'autres facteurs potentiels de virulence des souches NTEC

existaient déjà à cette époque : la toxine CDT-III, ainsi que les adhésines F17, Pap, Afa-VIII et Sfa. Enfin, nous avons mis au point deux PCR multiplexes permettant la détection des gènes codant pour les facteurs potentiels de virulence précités, ainsi que pour le sidérophore aérobactine.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Les souches NTEC2 sont capables de coloniser l'intestin, de provoquer une diarrhée persistante, de passer dans le système circulatoire et d'atteindre les organes internes après inoculation par voie orale chez des veaux colostrum-restreints.

De plus, le, ou les, facteur(s) responsable(s) de l'apparition de la diarrhée se trouve(nt) sur le plasmide Vir de la souche 1404. Il s'agit de la toxine CNF2, seule ou en collaboration avec d'autres facteurs, tels que l'adhésine F17 qui semble être responsable de la colonisation intestinale. Cependant, l'inoculation d'une série de veaux avec une souche 1404 $\Delta f17$ serait nécessaire pour en avoir confirmation. De plus, la toxine CDT-III, de part son action sur le cycle cellulaire, a pour cible principale les tissus en perpétuel renouvellement. Cette toxine pourrait donc jouer un rôle, non pas dans l'apparition de la diarrhée, mais dans son entretien en empêchant l'épithélium de se renouveler.

Le, ou les, facteur(s) responsable(s) de l'invasion se trouve(nt) également sur le plasmide Vir de la souche 1404. Il ne s'agit en apparence ni de la toxine CNF2 ni de la toxine CDT-III, individuellement. Cependant, ici encore, CDT-III pourrait jouer un rôle, non pas directement dans la pathogénicité, mais dans la potentialisation des effets de CNF2, en facilitant l'invasion. Le rôle des autres facteurs de virulence potentiels tels que résistance au sérum et production d'aérobactine n'ont pas été investigués ici. Ces différentes observations pourraient être confirmées ou infirmées en inoculant plusieurs séries de veaux avec une souche H209 dans laquelle aurait été introduit le plasmide Vir muté au niveau des gènes codant pour la toxine CNF2 ou CDT-III. De plus, si au niveau moléculaire et cellulaire, les trois protéines constituant la toxine CDT, CDT-A, CDT-B et CDT-C, sont nécessaires pour obtenir un effet, il n'en est peut-être pas de même *in vivo*. L'inoculation de veaux avec la souche 1404 mutée au niveau des gènes *cdt-IIIB* ou *cdt-IIIC* permettrait de s'en assurer.

REMERCIEMENTS

Les travaux sur les souches NTEC ont bénéficié de l'appui financier de la Commission européenne (Action à frais partagés FAIR3-CT96-1335) et de la DGVI du Ministère fédéral des Classes moyennes et de l'Agriculture (Convention de Recherches 5936).

RÉFÉRENCES

- CAPRIOLI A., FALBO V., RODA L.G., RUGGERI F.M., ZONA C. Partial purification and characterisation of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect. Immun.*, 1983, **39**, 1300-1306.
- DE RYCKE J., GONZALES E.A., BLANCO J., OSWALD E., BLANCO M., BOIVIN R. Evidence for two types of cytotoxic necrotizing factor in human and animal isolates of *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 1990, **28**, 694-699.
- OSWALD E., DE RYCKE J., LINTERMANS P., VAN MUYLEN 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.
- OSWALD E., SUGAI M., LABIGNE A., WU H.C., FIORENTINI C., BOQUET P., O'BRIEN A.D. Cytotoxic necrotizing factor type-2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994, **91**, 3814-3818.
- PERES S.Y., MARCHES O., DAIGLE F., NOUGAREYDE J-P., HERAULT F., TASCA C., DE RYCKE J., OSWALD E. A new cytolethal distending toxin (CDT) from *Escherichia coli* producing CNF2 blocks HeLa cell division in G2/M phase. *Mol. Microbiol.*, 1997, **24**, 1095-1107.
- POHL P., OSWALD E., VAN MUYLEN K., JACQUEMIN E., LINTERMANS P., MAINIL J. *Escherichia coli* producing CNF1 and CNF2 cytotoxins in animals with different disorders. *Vet. Res.*, 1993, **24**, 311-315.
- SMITH H.W. Observations on *Escherichia coli* infections in calves. In : Rutter J.M. (Ed.), Proceedings of the First Seminar on Pathology in the CEC Program of Coordination of Research in Beef Production. Perinatal III-Health in Calves., 1975, 47-59.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

- VAN BOST S., MAINIL J. Reproduction of lesions and clinical signs with a CNF2-producing *Escherichia coli* in neonatal calves. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1999, **473**, 125-128.
- VAN BOST S., BÂBE M-H., JACQUEMIN E., MAINIL J. Characteristics of necrotoxicogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic and diarrheic calves between 1958 and 1970. *Vet. Microbiol.*, 2001, **82**, 311-320.
- VAN BOST S., ROELS S., MAINIL J. Necrotoxicogenic *Escherichia coli* type-2 invade and cause diarrhoea during experimental infection in colostrum-restricted newborn calves. *Vet. Microbiol.*, 2001, **81**, 315-329.
- VAN BOST S., JACQUEMIN E., OSWALD E., MAINIL J. Multiplex PCRs for identification of necrotoxicogenic *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 2003, **41**, 4480-4482.
- VAN BOST S., MAINIL J. Facteurs de virulence spécifiques des souches invasives d'*Escherichia coli*: III) Production de toxines. *Ann. Med. Vet.*, 2003, **147**, 327-342.
- VAN BOST S., ROELS S., OSWALD E., MAINIL J. Putative roles of the CNF2 and the CDT-III toxins in experimental infections with necrotoxicogenic *Escherichia coli* type2 (NTEC2) strains in calves. *Microb. Infect.*, 2003, **5**, 1189-1193.