

THÈSE DE DOCTORAT EN SCIENCES VÉTÉRINAIRES

Résumé

- Orientation:** Médecine vétérinaire
- Titre de la thèse en français :** Recherche d'adhésines spécifiques de souches entérohémorragiques et entéropathogènes bovines d'*Escherichia coli* (EHEC et EPEC) du sérotype O26
- Titre de la thèse en anglais :** Search for specific adhesins of enterohaemorrhagic and enteropathogenic bovine *Escherichia coli* strains (EHEC and EPEC) of O26 serogroup
- Candidat :** Mihai SZALO
- Promoteur :** Professeur Jacques MAINIL
- Département et Service :** Département des Maladies infectieuses, Service de Bactériologie, Faculté de Médecine vétérinaire, Université de Liège, Belgique
- Date de la défense publique :** 3 septembre 2007
- Composition du Jury :** Professeurs et Docteurs L. Beutin (NRL-E. coli, BfR, Allemagne), B. China (ISP), G. Daube, M.L. Scippo, J.-M. Godeau, L. Grobet, F. Haesebrouck (UG), A. Linden, J. Mainil, E. Thiry

DESCRIPTION DU SUJET DE RECHERCHE ABORDÉ

L'espèce *Escherichia coli* est hétérogène, contenant des souches pathogènes et des souches inoffensives. La classification des différentes souches pathogènes est basée sur leurs propriétés spécifiques de virulence. Les souches pathogènes d'*E. coli* sont en effet associées à des pathologies variées. Certaines souches ne franchissent pas la barrière intestinale produisant des lésions d'entérite, associées à de la diarrhée et d'autres souches pathogènes d'*E. coli* peuvent franchir la barrière intestinale, produisant de la septicémie, avec des complications variables selon les organes infectés. Ces souches interagissent avec l'hôte d'une manière particulière produisant des lésions typiques au niveau cellulaire et tissulaire. Ces interactions spécifiques sont dues

aux propriétés de virulence spécifiques après la colonisation de l'intestin. L'étape de colonisation de l'intestin se fait grâce à des adhésines particulières, spécifiques pour chaque groupe de souches pathogènes d'*E. coli*. Il semble que ces adhésines n'ont pas seulement le rôle d'initialiser l'interaction entre l'hôte et le pathogène mais qu'elles soient responsables aussi de la spécificité d'hôte présentée par certaines souches pathogènes. Ainsi la connaissance de ces adhésines permet la reconnaissance de la véritable spécificité d'hôte de ces souches et l'évaluation de leur potentiel zoonotique. L'objectif général du travail était d'identifier des structures bactériennes impliquées dans l'adhérence aux entérocytes et, donc, dans la colonisation intestinale par des souches entérohémorragiques (EHEC), entéropathogènes (EPEC)

et vérotoxigènes (VTEC) bovines, et qui représenteraient une base de la spécificité d'hôte de ces souches, en ciblant plus particulièrement le sérotype somatique O26.

Pour accomplir l'objectif de ce travail, deux approches ont été suivies : immunologique et génétique. L'approche immunologique a utilisé l'avantage de l'anticorps monoclonal 2F3 (Kerr *et al.*, 1999) qui a été dérivé contre des extraits protéiques de membrane d'une souche EHEC bovine du sérotype O26. Le travail a consisté à identifier l'antigène reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3, à déterminer sa base génétique et à l'utiliser en tant qu'outil d'épidémiologie moléculaire.

Le travail dans l'approche génétique a consisté à rechercher, par des épreuves de PCR et d'hybridation sur colonies sur une collection de souches EHEC,

EPEC et VTEC bovines et humaines la présence de gènes d'opérons qui codent pour différents fimbriae de type I, II, III et IV : (i) des adhésines potentielles des souches EHEC et EPEC humaines, telle que LfA, Iha, LpfA, BfpA; (ii) des adhésines fimbriaires (CS31A et F17) et afimbriaires la famille Afa (Afa III, Afa VII, Afa VIII et F1845) présentes chez d'autres catégories de souches d'*E. coli* pathogènes pour le bovin.

RÉSULTATS

Les travaux effectués ont tout d'abord permis de confirmer que l'anticorps monoclonal 2F3 est spécifique pour les souches EPEC et EHEC du séro-groupe O26 et ne reconnaît pas les souches non-EHEC non-EPEC, sans cependant qu'il puisse faire la différence entre les souches EHEC et EPEC d'origine humaine et animale, c'est-à-dire en fonction de leur hôte.

Dans la partie des recherches consacrée à l'étude de cet anticorps, il a été aussi démontré que : i) l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3 est une composante du lipopolysaccharide (LPS) des souches EPEC et EHEC du séro-groupe O26 ; ii) la base génétique de cet épitope est situé dans l'opéron codant pour l'antigène O26 ; et iii) le caractère 2F3+ peut néanmoins être dissocié du caractère O26+ par mutagenèse par transposition aléatoire dans une souche EHEC bovine. Néanmoins, les résultats de ces travaux n'ont pas permis d'expliquer la raison pour laquelle l'anticorps monoclonal 2F3 reconnaît les souches EPEC et EHEC O26, mais non les souches non-EPEC et non-EHEC O26. En effet, le séquençage de l'opéron codant pour l'antigène O26 (locus *rfb*) d'une souche non-EHEC non-EPEC et sa comparaison avec la séquence publiée de l'opéron *rfb* d'une souche O26 EHEC n'a pas permis de reconnaître une dif-

férence pouvant expliquer la reconnaissance par l'anticorps 2F3.

Les résultats obtenus dans le cadre des travaux selon l'approche génétique ont montré que : i) toutes les souches EHEC bovines et humaines appartenant aux sérogroupes O145 et O157 étaient positives pour la sonde LpfA (les gènes *lpfA* codent pour des pili de type IV), mais aucune souche appartenant aux autres sérogroupes (O5, O26, O103, O111 et O118); ii) une grande majorité des souches EHEC et EPEC bovines et humaines aux sérogroupes O5, O26, O103, O111 et O118 étaient positives pour la sonde LfA (les gènes *lifA* codent pour des adhésines encore peu caractérisées), mais pas celles appartenant aux sérogroupes O145 et O157; iii) des proportions variables de souches appartenant à ces différents sérogroupes étaient positives pour la sonde Iha (les gènes *iha* codent aussi pour des adhésines peu caractérisées); et iv) dix souches EPEC bovines O26 sur les douze étudiées étaient positives pour la sonde ClpE (dérivée du gène codant pour la protéine chaperone du fimbria CS31A produit par des souches entérotoxinogènes et septicémiques bovines et porcines d'*E. coli*), alors que les souches EHEC bovines et humaines du même séro-groupe, ainsi que toutes les souches des autres sérogroupes, étaient négatives pour cette sonde.

Comme les souches EHEC O157 et O145 présentent le même pathotype, il semblerait que la présence des gènes *lpfA* et l'absence des gènes *lifA* soient associées plus à un pathotype particulier qu'à un, ou quelques sérogroupes. En ce qui concerne les résultats avec la sonde ClpE sur les souches EPEC bovines O26, il est possible que ces souches ne possèdent pas l'opéron *clp* complet puisque toutes les souches étaient négatives pour la sonde *clpG* (codant pour la sous-unité majeure du fimbria

CS31A). Il est cependant aussi possible que le gène *clpE*-like de ces souches appartienne à un opéron complet dont la sous-unité majeure soit différente de ClpG.

Enfin, la recherche des gènes intervenant dans la biosynthèse d'adhésines de la famille Afa (Afa III, Afa VII, Afa VIII and F1845), surtout produites par des souches uropathogènes humaines et sur certaines souches septicémiques animales, dans la collection des souches VTEC d'origine bovine de séro-groupe O8 et O20 a permis la mise en évidence de deux souches VTEC de séro-groupe O8 qui possèdent les gènes *afa-8D/afa-8E* et qui expriment l'adhésine Afa 8E.

CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Au cours de nos travaux une série de résultats, qui pourront amener à une meilleure compréhension des mécanismes de pathogénicité et des souches EPEC, EHEC et VTEC ont été réalisés. Cependant, l'objectif général du projet - la description de facteurs spécifiques de l'hôte impliqués dans le processus d'adhérence initiale des souches EPEC, EHEC et VTEC bovines permettant la colonisation intestinale, afin de pouvoir les diagnostiquer et de les typer de manière spécifique - n'a pas été atteint.

À court terme, les compléments de travaux à envisager sont la poursuite des essais d'identification de l'épitope reconnu par l'anticorps monoclonal 2F3 et le rôle dans l'adhérence aux cellules eucaryotes, comme les entérocytes bovines et humains, des adhésines dont les gènes ont été détectés dans les souches EHEC et EPEC bovines et humaines appartenant à différents sérogroupes.

REFERENCES

- BIELASZEWSKA M., ZHANG W., TARR P.I., SONNTAG A.K., KARCH H. Molecular profiling and phenotype analysis of *Escherichia coli* O26:H11 and O26:NM: secular and geographic consistency of enterohemorrhagic and enteropathogenic isolates. *J. Clin. Microbiol.*, 2005, **43**, 4225-4228.
- D'SOUZA J.M., WANG L., REEVES P. Sequence of the *Escherichia coli* O26 O antigen gene cluster and identification of O26 specific genes. *Gene*, 2002, **297**, 123-127.
- KERR P., BALL H., CHINA B., MAINIL J., FINLAY D., POLLOCK D., WILSON I., MACKIE D. Use of a monoclonal antibody against an *Escherichia coli* O26 surface protein for detection of enteropathogenic and enterohemorrhagic strains. *Clin. Diagn. Lab Immunol.*, 1999, **6**, 610-614.
- LALIOUI L., JOUVE M., GOUNON P., LE BOUGUENEC C. Molecular cloning and characterization of the *afa-7* and *afa-8* gene clusters encoding afimbrial adhesins in *Escherichia coli* strains associated with diarrhea or septicemia in calves. *Infect. Immun.*, 1999, **67**, 5048-5059.
- LOW A.S., HOLDEN N., ROSSER T., ROE A.J., CONSTANTINIDOU C., HOBMAN J.L., SMITH D.G., LOW J.C., GALLY D.L. Analysis of fimbrial gene clusters and their expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Environ. Microbiol.*, 2006, **8**, 1033-1047.
- MAINIL J.G., DAUBE G. Verotoxigenic *Escherichia coli* from animals, humans and foods: who's who? *J. Appl. Microbiol.*, 2005, **98**, 1332-1344.
- NATARO J.P., KAPER J.B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 1998, **11**, 142-201.
- STEVENS M.P., VAN DIEMEN P.M., FRANKEL G., PHILLIPS A.D., WALLIS T.S. Efa1 influences colonization of the bovine intestine by shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O5 and O111. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5158-5166.
- TARR P.I., BILGE S.S., VARY J.C., JR., JELACIC S., HABEEB R.L., WARD T.R., BAYLOR M.R., BESSER T.E. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect. Immun.*, 2000, **68**, 1400-1407.
- TOMA C., MARTINEZ E.E., SONG T., MILIWEBSKY E., CHINEN I., IYODA S., IWANAGA M., RIVAS M. Distribution of putative adhesins in different seropathotypes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.*, 2004, **42**, 4937-4946.
- TORRES A.G., GIRON J.A., PERNA N.T., BURLAND V., BLATTNER F.R., AVELINO-FLORES F., KAPER J.B. Identification and characterization of *lpfABCC'DE*, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect. Immun.*, 2002, **70**, 5416-5427.

PUBLICATIONS ISSUES DU TRAVAIL DE THÈSE

SZALO M. GOFFAUX F., PIRSON V., PIERARD D., BALL H.J., MAINIL J. Presence in bovine enteropathogenic (EPEC) and enterohaemorrhagic (EHEC) *Escherichia coli* of genes coding for putative adhesins of human EHEC strains. *Res. Microbiol.*, 2002, **153**, 653-658.

SZALO I.M., TAMINIAU B., GOFFAUX F., PIRSON V., McCAPPIN J., BALL H.J., MAINIL J. The 2F3 monoclonal antibody recognises the O26 O-antigen moiety of the lipopolysaccharide of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strain 4276. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2004, **11**, 532-537.

SZALO M., TAMINIAU B., MAINIL J. Le lipopolysaccharide d'*Escherichia coli* : structure, biosynthèse et rôles. *Ann. Méd. Vét.*, 2006, **150**, 108-124.

La séquence du locus *rfb* de la souche non-EHEC non-EPEC du sérotype O26 a été déposée dans GeneBank (numéro d'accès DQ196413)

REMERCIEMENTS

Ce travail de recherches a pu être réalisé grâce à des financements fédéraux (Service public fédéral Santé publique, Sécurité de la Chaîne alimentaire et Environnement, conventions 6011 et 6115) et européens (5^e Programme-cadre, projet à frais partagés QLK2-2000-00600).