



Identification of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) effector functions that inhibit the host innate immune response pathway

Sabine Quitard

► **To cite this version:**

Sabine Quitard. Identification of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) effector functions that inhibit the host innate immune response pathway. *Biologie cellulaire*. 2011. <hal-01479158>

HAL Id: hal-01479158

<https://hal-ephe.archives-ouvertes.fr/hal-01479158>

Submitted on 28 Feb 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

Présenté

par

Sabine Quitard

Pour l'obtention du diplôme de l'École Pratique des Hautes Études

TITRE: Identification of Enteropathogenic E. coli (EPEC) effector functions that
inhibit the host innate immune response pathway

Soutenu le 19 Octobre 2011 devant le jury suivant:

Dr Marie-Christine Lebart - Présidente

Pr Thierry Dupressoir - Rapporteur

Dr Antoine Gross - Examineur

Pr Brenan Kenny - Directeur scientifique

Pr Yves Benyamin - Directeur pédagogique

Mémoire préparé sous la direction de:

Brendan Kenny (brendan.kenny@ncl.ac.uk)

Laboratoire Pathogenicity of enteropathogenic (EPEC) and enterohemorrhagic
(EHEC) Escherichia coli, ICAMB, Medical School, Framlington Place, NE2 4HH,
Royaume Uni

Et de

Yves Benyamin (benyamin@univ-montp2.fr)

Laboratoire de Laboratoire de Motilité Cellulaire, EPHE-UMR 5235, Bt.
24/cc107/étage 4, USTL, place E. Bataillon F -34090 Montpellier

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES

SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

IDENTIFICATION OF ENTEROPATHOGENIC E. COLI (EPEC) EFFECTOR FUNCTIONS THAT INHIBIT THE HOST INNATE IMMUNE RESPONSE PATHWAY

Sabine Quitard

19 Octobre 2011

RÉSUMÉ

EPEC colonise l'intestin grêle et cause des diarrhées aqueuses sévères chez l'homme et la mort de milliers d'enfants chaque année dans les pays en voie de développement. Ce pathogène code des facteurs de virulence distribués sur sept loci de pathogénèse. Le locus LEE (Locus of Enterocyte Effacement) code un appareil de sécrétion de type III, les effecteurs permettant la formation de lésions cellulaires caractéristiques appelées « Attaching and Effacing » et la perturbation des mécanismes de sécrétion et d'absorption des cellules intestinales. Le LEE est essentiel dans la pathogénèse d'EPEC; cependant des effecteurs codés en dehors du locus LEE joueraient un rôle essentiel dans l'inhibition de la réaction inflammatoire. Des études indiquent qu'EPEC inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B, élément central de la réponse immunitaire innée, capable d'activer la production de l'antimicrobien oxyde nitrique et de la chemokine interleukine-8 permettant le recrutement de cellules immunitaires sur le site d'infection.

Les effecteurs impliqués dans l'inhibition de la réaction inflammatoire sont inconnus. Le but du projet est donc de déterminer le ou les effecteurs capables d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF- κ B et de l'interleukine-8 afin de définir le mécanisme par lequel EPEC échappe au système immunitaire.

MOTS CLÉS : EPEC, effecteurs, non-LEE, réaction inflammatoire, NF- κ B, interleukine-8, phagocytose

Table des matières

Liste des figures	4
Liste des tableaux	Erreur ! Signet non défini.
Liste des annexes	Erreur ! Signet non défini.
Abréviations	6
Evolution d'Escherichia coli commensal en pathogène	9
1. Transfert horizontal de larges éléments génomiques : les loci de pathogénèse	9
2 Facteurs de virulence	10
2.1 Facteurs facilitant la survie	10
2.2 Facteurs facilitant la colonisation	10
2.2.1 Adhésines de type Fimbriae	10
2.2.2 Adhésines de type non-fimbriae	11
2.3 Les systèmes de sécrétion	12
2.3.1 Les voies générales de sécrétion	12
2.3.2 Systèmes de sécrétion Sec-dépendants	12
2.4 Toxines et effecteurs	13
2.4.1 Toxines entériques	14
2.4.2 Effecteurs	14
2.5 Conclusion	147
3. Escherichia coli diarrhéiques	15
Escherichia entéropathogène et ses facteurs de virulence	17
1. Le locus LEE	17
1.1 L'appareil sécrétoire de type III d'EPEC	18
1.2 Les Effecteurs du LEE	18
2. Le plasmide pEAF	19
3 Les loci de pathogénèse Non-LEE	19
4. Autres facteurs de virulence	20
5. Conclusion	20
Escherichia entéropathogène et déclenchement de la diarrhée	21
1. Echappement au système immunitaire	21

<u>2. Déstabilisation de l'homéostasie de l'épithélium</u>	22
<u>2.1 Déstabilisation des jonctions serrées</u>	22
<u>2.2 Inhibition des mécanismes d'absorption et de sécrétion d'électrolytes</u>	23
<u>3. Conclusion</u>	24
<u>Le projet de recherche : identification des effecteurs inhibant la réaction inflammatoire</u>	25
<u>1. Le but du projet</u>	25
<u>2. Les stratégies utilisées</u>	26
<u>Résultats de la première stratégie : génération d'une souche non-pathogène non flagellée capable de former l'appareil de sécrétion de type III</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1. Mutation des flagelles de la souche MG1655</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1.1 La délétion des gènes régulateurs des flagelles</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1.2 Le flagella mutant n'induit pas la production d'IL-8</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2. Génération d'une souche MG1655 capable d'exprimer l'appareil de type III</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.1 Génération d'un plasmide exprimant l'appareil de sécrétion de type III du LEE</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.2 L'expression du LEE Quad par le plasmide pBAC ne permet pas la sécrétion d'effecteurs</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.3 L'expression chromosomique du LEE ne permet pas une sécrétion et une translocation suffisantes des effecteurs</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>3. Discussion</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>Résultats de la deuxième stratégie : délétion des « Pathogenicity Island » et leur rôle dans l'inhibition du facteur de transcription NF- B</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1. Rôle des loci de pathogénèse dans l'inhibition de la production d'IL-8</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1.1 Génération de mutants</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1.2 Les loci PP4 et IE5 semblent jouer un rôle dans l'inhibition de la production d'IL-8</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1.3 NleC et NleD sont des endopeptidases capables d'inhiber la réaction inflammatoire</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1.4 Le PAI IE5 est-il impliqué dans l'inhibition de la réaction inflammatoire ?</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1.5 Le mécanisme d'inhibition de la réaction inflammatoire par EPEC</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2. Rôle des locus de pathogénèse dans l'inhibition de la phagocytose</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.1 Rôle des loci de pathogénèse dans l'inhibition de la phagocytose</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.2 Plusieurs effecteurs sont impliqués dans l'inhibition de la phagocytose</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.3 Mécanismes d'inhibition de la phagocytose</u>	Erreur ! Signet non défini.

<u>Discussion</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>Conclusion</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>Matériels et Méthodes</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>1. lignées cellulaires, plasmides et oligonucléotides</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2. Génération de mutation chromosomique</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.1 La méthode Lambda Red</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>2.2 Echange allélique</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>3. Extraction de protéines</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>3.1 Isolation des protéines sécrétées par les bactéries</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>3.2 Fractionnation des cellules mammaliennes</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>4. Induction de la sécrétion d'interleukine 8</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>5. Inhibition de la sécrétion d'interleukine 8</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>6. Internalisation des bactéries par les macrophages</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>7. Inhibition de la phosphorylation de la protéine Akt</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>8. Immunoblotting</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>9. Quantification de western Blots</u>	Erreur ! Signet non défini.
<u>Références</u>	27
<u>Annexes</u>	Erreur ! Signet non défini.

Abréviations

_ : deletion

ADN: Acid DeoxyriboNucleic

A/E : Attaching and Effacing

AKT (PKB): serine-threonine protein Kinase

ARN: Acid RiboNucleic

AT: autotransporté

ATP: Adénosine Tri-Phosphate

BAC : Bacterial Artificial Chromosome

pb: paire de bases

CR3 : Complement Recepteur

CS: Coli Surface antigène

DAEC : *E. coli* à Adhérence Diffuse

DRA : intestinal anion exchanger Down Regulated in Adenoma

EAEC : *E. coli* Entéro-Agrégative

EHEC : *E. coli* Entéro-Hémorragique

EIEC : *E. coli* Entéro-Invasif

ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSandwich Assay

EPEC: *E. coli* Entéropathogénique

Esp : *E. coli* Secreted Protein

ETEC : Entérotoxique *E. coli*

GlrA: Global LEE Regulator Activator

GlrR: Global LEE Regulator Repressor

Hcp : Haemolysin Co-regulated Protein

IL-8: Interleukine 8

iNOS: Inducible Nitric Oxide synthetase

JAM : Junctional Adhesion Molecule

JNK: c-Jun N-terminal Kinase

LEE: Locus of Enterocyte Effacement

Ler: LEE Encoded Regulator

LifA: Lymphocyte Inhibitory Factor

Map: Mitochondrial Associated Protein

MLC: Myosine Light Chain

MLCK: Myosine Light Chain Kinase
NF_B: Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NHE3: Sodium Hydrogen Exchanger isoform 3
Nle: Non-LEE Encoded
Orf: Open Reading Frame
PAI: Pathogenicity Island
PAMP: Pathogen Associated Molecular Pattern
PCR: Polymerase Chain Reaction
PI3 kinase: PhosphoInositide 3 kinase
PRR: Pattern Recognition Pattern
QS: Quorum Sensing
Quad: Quadruple
RPS3: Ribosomal Protein S3
SGLT1: Sodium-Glucose Transporter
TAA: Trimeric Auto Transported
TAT: Twin-Arginine Translocase
Tir: Translocated Intimin Receptor
TLR: Toll-Like Receptor
TNF: Tumor Necrosis Factor
TSS: Type Secretion System
UPEC: Uropathogenic *E. coli*
Vgr: Valine-Glycine Repeat
ZO: Zona Occludens

Identification of Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) effector functions that inhibit the host innate immune response pathway

Identification des effecteurs injectés par EPEC capables d'inhiber la
réponse immunitaire innée de l'hôte

E. coli est une bactérie commensale qui colonise le tractus intestinal. Cependant au cours de l'évolution, l'intégration d'éléments génétiques a permis la génération de nombreux pathogènes diarrhéiques dont *E. coli* entéropathogène (EPEC). Ces pathogènes ont acquis des facteurs de virulence capables de favoriser la colonisation et la survie des pathogènes dans de nouvelles niches, de contourner le système immunitaire de l'hôte et de perturber les fonctions normales de la cellule intestinale afin d'induire une diarrhée.

EPEC colonise l'intestin grêle et cause des diarrhées aqueuses sévères chez l'homme et la mort de milliers d'enfants chaque année dans les pays en voie de développement. Les facteurs de virulence sont situés dans des régions spécifiques du chromosome appelées loci de pathogénèse et dans un plasmide codant des facteurs de colonisation et de régulation.

Le séquençage du génome d'EPEC a permis d'identifier sept loci de pathogénèse acquis par transfert horizontal. Le LEE (« Locus of Enterocyte Effacement ») est le premier locus découvert et joue un rôle essentiel dans le déclenchement de la maladie. Ce locus code un appareil sécrétoire de type III et les facteurs de virulence impliqués dans la formation de lésions appelées « Attaching and Effacing » (A/E) caractérisées par une adhésion intime à l'épithélium et l'effacement des microvilli absorbants. Le LEE code également les facteurs de virulence impliqués dans la destruction de la barrière intestinale menant à la diarrhée. Des facteurs de virulence, codés en dehors du LEE et injectés par l'appareil de sécrétion de type III, joueraient un rôle dans la colonisation, et confèreraient à EPEC la capacité d'échapper au système immunitaire en inhibant la réaction inflammatoire de l'hôte.

Des études montrent qu'EPEC inhibe l'activation du facteur de transcription NF- κ B, élément central dans la réponse immunitaire innée. Ce facteur de transcription fait parti d'une cascade de signalisation menant à la production de cytokines, de chemokines et d'enzymes inductibles. Afin de définir le mécanisme par lequel

EPEC échappe au système immunitaire pour survivre dans le lumen intestinal, il est nécessaire de déterminer le ou les effecteurs capables d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF- κ B.

Evolution d'*Escherichia coli* commensal en pathogène

E. coli est un bacille gram négatif de la famille des Enterobacteriaceae qui colonise le tractus intestinal. Ce commensal est le plus abondant de la microflore intestinale, il est bénéfique à l'hôte et cause rarement des maladies [1, 2]. Cependant la plasticité génomique de cette bactérie a permis l'évolution de pathogènes [3]. L'intégration d'éléments génétiques étrangers par transfert horizontal confère aux micro-organismes des facteurs de virulence facilitant la colonisation et la survie dans des nouvelles niches.

1. Transfert horizontal de larges éléments génomiques : les loci de pathogénèse

L'acquisition de matériel génétique provenant d'autres organismes par transfert horizontal joue un rôle important dans l'évolution des micro-organismes. La souche non pathogène *E. coli* MG1655 contiendrait environ 18% d'éléments génétiques étrangers et les souches pathogènes telles qu'EPEC contiennent en plus de larges régions génomiques conférant leur virulence [3]. Ces régions appelées loci de pathogénèse ou « Pathogenicity Islands » (PAI) peuvent être acquises par une transformation naturelle (transfert non spécifique d'ADN présent dans l'environnement), une transduction (transfert d'ADN provenant de phages) ou par conjugaison (transfert d'ADN entre bactéries par l'intermédiaire de pili sexuels) [4].

Les « Pathogenicity Island » (PAI) sont de larges régions génomiques de 10 à 200 kilo bases codant des facteurs de virulence. Ces régions sont généralement présentes chez les bactéries pathogènes et sont absentes chez les bactéries non-pathogènes de la même espèce [5].

La composition de ces loci exprimée en pourcentage de cytosine et guanine (G+C) diffère du reste du génome appuyant l'hypothèse du transfert horizontal, c'est-à-dire le transfert de matériel génétique provenant d'autres organismes [3, 5].

Les PAI sont intégrés dans des régions spécifiques du chromosome et sont associés dans 75% des PAI étudiés à des gènes d'ARNt [3, 5]. Les gènes ARNt semblent être des sites d'intégration d'ADN provenant de plasmides ou de phages. De plus les éléments génétiques mobiles tels que les gènes codants des intégrases et des transposons permettent l'intégration, la délétion et la mobilité de ces PAI, d'où leur instabilité [5].

2 Facteurs de virulence

Les PAI et les plasmides codent de nombreux facteurs de virulence permettant la colonisation, la survie des pathogènes dans de nouvelles niches, la sécrétion et la translocation de toxines et /ou effecteurs capables de perturber les fonctions normales de la cellule hôte et d'induire la maladie [5-7].

2.1 Facteurs facilitant la survie

Les bactéries ont déployés diverses stratégies afin de survivre dans leur environnement. Une de ces stratégies est d'augmenter les ressources en ions ferreux. Le fer, difficile d'accès de par sa toxicité, est un élément essentiel pour la plupart des organismes [8]. La principale ressource en fer accessible aux bactéries est dans les systèmes biologiques où le fer est séquestré dans les métalloprotéines. Ainsi les bactéries ont développé deux mécanismes afin de s'approprier le fer séquestré: l'expression de récepteurs membranaires spécifiques aux transporteurs de fer tels que l'hème, l'hémoglobine, la transferrine et la sécrétion de sidérophores capables de chélater les ions ferreux [5, 8].

Ces systèmes de fixation du fer sont essentiels pour les bactéries pathogènes, mais des souches non pathogènes utilisent également ces mécanismes [5].

2.2 Facteurs facilitant la colonisation

La colonisation d'une niche est favorisée par l'expression de molécules d'adhésions ou adhésines à la surface des bactéries. Ces molécules sont également impliquées dans la motilité et la propagation de ces micro-organismes vers différents organes, le transport de protéines ou d'ADN, et la médiation de signaux cellulaires pour influencer le système immunitaire ou faciliter l'invasion [9]. Il existe deux types d'adhésines : les adhésines de type fimbriae et non-fimbriae.

Les adhésines de type fimbriae ou pili sont des organelles filamenteuses protéiques ancrées dans la membrane externe des bactéries gram négatives [10]. Les adhésines de type non-fimbriae sont généralement des protéines de surface mono ou oligomériques pouvant être sécrétées ou auto transportées [11].

2.2.1 Adhésines de type Fimbriae

Les pili de type I sont rencontrés dans 80% des souches sauvages d'*E.coli* et permettent l'adhésion avec des cellules épithéliales [10, 12]. Les souches commensales expriment à la surface du pilus l'adhésine FimH qui a une affinité pour les récepteurs contenant du tri-mannose alors qu'*E.coli* uropathogène (UPEC) exprime FimH qui a développé une affinité pour le mono-mannose abondant dans le tractus urinaire, d'où l'association de ce pathogène aux infections urinaires [13].

Les Curli sont de fines fibres ayant des propriétés structurales et biochimiques comparables aux fibres amyloïdes associées aux maladies d'Alzheimer et de Parkinson chez l'homme [13, 14]. Ces fibres sont capables d'interagir avec de nombreuses protéines afin de faciliter l'adhésion et la dissémination des pathogènes. Les pathogènes exprimant ce type de pili sont associés aux septicémies par leur capacité de fixer le fibrinogène et le facteur XII afin de ralentir la coagulation, ou de fixer la plasmine, une sérine protéase capable de dissoudre la fibrine des caillots sanguins [13, 14]. De plus, ces structures permettraient l'internalisation des bactéries ; en effet la souche E.coli K12 exprimant des curli via un plasmide induit son internalisation dans diverses lignées de cellules épithéliales [15].

Les pili de type IV, apparentés aux flagelles des archaebactéries et à l'appareil sécrétoire de type IV, permettraient la translocation de molécules d'ADN et sembleraient servir de récepteur aux bactériophages [11, 13, 16, 17]. Le pouvoir de rétraction de ces organes est très caractéristique et permet non seulement l'adhésion mais également la motilité des bactéries à la surface des cellules hôtes. Les pili de type IV sont capables de s'agréger et sont responsables de la formation de micro-colonies à la surface des cellules hôtes. Ce type d'adhésion est observé avec EPEC.

2.2.2 Adhésines de type non-fimbriae

Les adhésines de type non-fimbriae sont des protéines mono ou oligomériques de surface et nécessitent un récepteur cellulaire afin de médier l'adhésion avec la cellule hôte [11].

Les adhésines trimériques auto-transportées (TAA pour « trimeric autotransported adhesin ») sont transportées via les systèmes de sécrétion de type V. Ces adhésines sont caractérisées par leur structure trimérique, et l'absence de clivage lorsque la protéine est externalisée [18].

De nombreuses adhésines sont ancrées dans la membrane externe de la paroi des bactéries et sont ainsi capables d'interagir avec des molécules d'adhésion exprimées par les cellules de l'hôte telles que les intégrines, les cadhérines ou les immunoglobulines [11, 19]. Dans le cas d'EPEC, l'adhésine Intimine interagit avec le récepteur Tir (« Translocated Intimin Recepteur »), d'origine bactérienne. EPEC est en effet capable d'injecter son propre récepteur dans la cellule hôte, où celui-ci est phosphorylé puis intégré dans la membrane de la cellule hôte afin d'interagir avec son ligand Intimine [11].

Les adhésines jouent un rôle important dans la pathogenèse des bactéries et la colonisation des organismes. Cependant la formation de ces adhésines de type fimbriae ou non-fimbriae est complexe et nécessite la sécrétion de molécules à travers la paroi bactérienne.

2.3 Les systèmes de sécrétion

Les bactéries gram négatives, dont la paroi comprend deux membranes phospholipidiques et une fine couche de peptidoglycane, ont déployé diverses stratégies afin de sécréter des facteurs de virulence vers le milieu extracellulaire. Sept types de systèmes de sécrétions (TSS) sont connus chez les bactéries gram négatives : de type I à type VI et chaperonne-usher. Ces systèmes de sécrétion permettent la sécrétion de molécules à travers la membrane externe et dépendent du système Sec ou directement à travers les membranes internes et externes indépendamment du système Sec [5, 20].

2.3.1 Les voies générales de sécrétion

Le système Sec est la principale voie de transport de protéines à travers la membrane interne et permet également l'insertion de protéines membranaires [21]. Les protéines précurseurs, synthétisées avec une séquence signal dans le cytoplasme bactérien, sont maintenues dans une conformation non-repliée par une chaperonne ; ce complexe est alors reconnu par une ATPase, le moteur permettant la translocation à travers un canal formé par un complexe protéique. Lors de la translocation ou après le transport de la protéine, la séquence signal est alors clivée [21, 22].

Un système secondaire TAT (« twin-Arginine Translocase ») permet le transport de protéines et de co-facteurs dans une conformation tridimensionnelle. La séquence signal est caractérisée par la présence de deux résidus arginine. Ce système est également impliqué dans la sécrétion de facteurs de virulence [22, 23].

2.3.2 Systèmes de sécrétion Sec-dépendants

Les systèmes de sécrétion de type II, V et chaperonne-usher permettent la sécrétion de protéines présentes dans l'espace péri plasmique à travers la membrane externe vers le milieu extracellulaire et dépendent donc de la voie Sec.

Le système de sécrétion de type II (T2SS) est associé à la sécrétion d'enzymes de dégradation et de toxines. Le T2SS bien que présent chez les bactéries non pathogènes est également associé à la virulence [5, 24].

Le système de sécrétion de type V (T5SS) correspond à la voie des protéines auto transportées et comprend les voies de type Va (ou AT), Vb (ou le système des 2 partenaires) et Vc (ou TAA). Les molécules sécrétées selon ces voies comprennent une séquence peptidique N-terminal, un domaine passager correspondant au domaine à sécréter et un domaine de translocation qui d'insère dans la membrane externe formant un pore. Après translocation le domaine passager peut être clivé. Dans la voie de type Va, le domaine passager et le domaine de translocation font parties de la même protéine alors que dans la voie de type Vb ces deux domaines sont des protéines distinctes. Dans le cas de la voie de type Vc, décrite pour les adhésines auto transportées, les protéines sont sécrétées sous forme trimérique. [25]

La voie chaperonne-usheer permet l'assemblage des organelles de surface telles que les pili de type I et de type P [20]. Cette voie fait appel à des chaperonnes péri plasmiques et au complexe usheer responsable de la translocation [26].

2.3.3 Systèmes de sécrétion Sec-indépendants

Les systèmes Sec-indépendants permettent la sécrétion de molécules présentes dans le cytoplasme bactérien directement dans le milieu extracellulaire ou dans le cytoplasme des cellules eucaryotes hôtes.

Le système de sécrétion de type I (T1SS) est un complexe de trois molécules qui traversent la membrane interne et externe. Ce complexe comprend un transporteur ancré dans la membrane interne qui apporte l'énergie nécessaire à la translocation, une protéine membranaire de fusion, et une protéine formant un pore dans la membrane externe. [11]

Le système de sécrétion de type III (T3SS) forme un complexe d'une vingtaine de protéines permettant l'injection de molécules directement dans la cellule hôte. Ce type de sécrétion est spécifique aux bactéries gram négatives pathogènes [5]. Le corps basal, similaire à celui des flagelles, comprend une protéine de la famille des sécrétines ancrée dans la membrane externe et un complexe protéique dans la membrane interne qui forment un canal continu entre les deux membranes. Une structure filamenteuse, comparable à l'aiguille d'une seringue, se projette vers le milieu extracellulaire ; l'aiguille se termine par un complexe qui forme un pore dans la membrane de la cellule hôte [27]. Les protéines injectées par le T3SS sont des facteurs de virulence appelés effecteurs impliqués dans la subversion de nombreuses fonctions de la cellule hôte afin de promouvoir l'adhésion, l'invasion et la survie des bactéries [28]. Cependant le système de sécrétion de type IV (T4SS) permet également la translocation d'effecteurs directement à travers la cellule hôte.

Le T4SS, apparenté aux systèmes de conjugaison, forme un complexe à travers la paroi bactérienne d'où se projette un pilus ou un canal sécrétoire qui permet d'entrer en contact avec la cellule receveuse. Ce système permet non seulement la translocation d'effecteurs comme le T3SS mais également la translocation d'ADN entre bactéries et l'intégration d'ADN provenant du milieu extracellulaire [29, 30]. Le T4SS contribue donc à la propagation des gènes de virulence, à la plasticité du génome bactérien et à l'altération des fonctions normales de la cellule hôte.

Le système de sécrétion de type VI (T6SS), associé aux bactéries pathogènes et symbiotiques, permet également l'injection de molécules dans le cytoplasme des cellules eucaryotes [31, 32]. Un corps complexe ancré dans la membrane interne permettrait le transport vers le périplasma des protéines Hcp (Haemolysine co-regulated protein) et VgrG (valine-glycine repeat). Hcp formerait dans le périplasma un canal en élévation et expulserait VgrG à travers la membrane externe de la paroi bactérienne et la membrane cytoplasmique des cellules eucaryotes (fig3) [33].

2.4 Toxines et effecteurs

Les toxines bactériennes et les effecteurs sont des molécules associées aux bactéries ou sécrétées qui agissent sur des cellules cibles eucaryotes et perturbent leur fonctionnement [34, 35].

2.4.1 Toxines entériques

Les toxines entériques perturbent les fonctions normales de l'épithélium intestinal et contribuent aux symptômes de la diarrhée. Elles induisent la sécrétion et /ou inhibent l'absorption d'ions par diverses mécanismes et sont classifiées selon leur fonction et selon leur mode d'action [35].

La classification fonctionnelle de ces toxines comprend quatre classes :

- Les toxines stimulant la sécrétion d'ions
- Les toxines altérant le cytosquelette
- Les toxines induisant des lésions cellulaires
- Les toxines induisant la production de seconds messagers du système nerveux entérique

La classification mécanistique comprend trois classes :

- Les toxines possédant une activité enzymatique
- Les toxines possédant un récepteur et induisant la production d'un second messager
- Les toxines s'insérant dans la membrane cytoplasmique pour former un pore perméable aux ions

2.4.2 Effecteurs

Les facteurs de virulence injectés via les systèmes de sécrétion de type III, IV et VI sont généralement appelés effecteurs [36]. Ces molécules possèdent des homologies structurales et fonctionnelles avec les protéines eucaryotes et sont ainsi capables d'interférer avec les fonctions de la cellule hôte [33, 37]. Les effecteurs possèdent des activités enzymatiques, régulatrices ou signalétiques afin de permettre l'invasion de cellules non-phagocytaires, d'inhiber la phagocytose ou la réponse inflammatoire, d'induire l'apoptose et de moduler le trafic intracellulaire.

2.5 Conclusion

E.coli est une bactérie commensale de la microflore intestinale où l'acquisition de plasmides et/ou de loci de pathogénèse a permis l'évolution de souches pathogènes pouvant induire des diarrhées, infecter le tractus urinaire, ou causer des septicémies et des méningites [38]. La capacité d'un organisme entérique d'infecter le tractus urinaire dans le cas d'UPEC (E.coli Uropathogénique) ou de coloniser les vaisseaux sanguins s'explique par la présence de pili et d'adhésines spécifiques.

Les adhésines et les systèmes de sécrétion jouent un rôle important dans la pathogénèse des bactéries. Les adhésines facilitent la colonisation et les systèmes de sécrétion permettent la sécrétion de nombreux facteurs de virulence qui perturbent les fonctions normales de la cellule eucaryote. Les organelles extracellulaires telles que les pili, les systèmes de sécrétion et même les flagelles sont confrontés aux mêmes problèmes physiologiques : le transport de protéines cytoplasmiques vers le milieu extracellulaire à travers deux membranes lipidiques. Ceci permet d'expliquer des origines ancestrales communes de certains des organelles telles que les flagelles, les pili et certains systèmes de sécrétion.

3. Escherichia coli diarrhéiques

Chaque année les diarrhées causent la mort de 2.5 à 5 millions d'individus dont 80% des enfants âgés de moins d'un an [39, 40] et *Escherichia coli* est l'une des causes majeures [41]. Les souches d'*E.coli* diarrhéiques sont capables de coloniser les muqueuses intestinales ; cependant leurs mécanismes pour déclencher la maladie diffèrent. Il existe sept types de pathogènes caractérisés par leur sérotype et leur mécanisme d'infection et possèdent un ou plusieurs PAI ou plasmides codant des facteurs de virulence : *E.coli* produisant la toxine « cytolethal distending », *E.coli* à adhérence diffuse (DAEC), *E.coli* entéro-toxique (ETEC), *E.coli* entéro-invasif (EIEC), *E.coli* entéro-agrégative (EAEC), *E.coli* entéro-hémorragique (EHEC) et *E.coli* entéro-pathogène (EPEC) [2, 41].

Nataro et Kaper ont classifié les principales souches diarrhéiques selon le mécanisme de déclenchement de la diarrhée :

- Sécrétion de toxines entériques (ETEC et EAEC)
- Invasion de cellules non-phagocytaires (EIEC)
- Intime adhérence avec signalisation membranaire (EPEC et EHEC)

Les pathogènes diarrhéiques ont développé une multitude de stratégies afin de coloniser le tractus intestinal, d'échapper au système immunitaire, et déclencher la diarrhée.

La colonisation est un facteur essentiel. ETEC colonise le intestin grêle et exprimerait plus de vingt facteurs de colonisation protéiques appelés CS (pour « coli surface antigène ») [42]. EAEC, caractérisée par une adhérence de type agrégative sur les cellules Hep-2, induit la production de mucus à la surface des bactéries afin de permettre son « incrustation » à la surface des cellules épithéliales. EPEC est aussi caractérisée par son adhérence et forme des micro-colonies ; ce type d'adhésion nécessite les pili de type IV appelés BFP (« Bundle Forming Pili »). EPEC induit des lésions caractéristiques appelées « Attaching and Effacing » (A/E) et nécessite l'injection d'effecteurs via l'appareil de sécrétion de type III [43]. Le terme A/E implique un attachement intime aux cellules épithéliales qui favorise la colonisation et l'effacement des microvilli.

Les bactéries déploient divers mécanismes afin d'échapper au système immunitaire. L'invasion des cellules intestinales par EIEC permettrait d'éviter l'activation de la réponse inflammatoire. Dans le cas d'EPEC l'injection d'effecteurs est essentielle pour inhiber la phagocytose par les macrophages et l'activation du facteur de transcription NF- κ B, élément central de la réponse immunitaire innée afin de survivre dans son environnement [44, 45].

Le déclenchement de la diarrhée est complexe et nécessite de nombreux facteurs de virulence afin de coloniser l'épithélium intestinal, de survivre dans cet environnement et de sécréter des molécules capables d'interférer avec les fonctions normales de la cellule intestinale. Les diarrhées sont caractérisées par une accumulation de liquide dans le lumen et sont causées par la destruction de la perméabilité intestinale, l'inhibition des mécanismes d'absorption et de sécrétion d'électrolytes associés au passage de molécules d'eau vers le lumen afin de compenser l'accumulation d'ions [46]. EPEC injecte de nombreux effecteurs dans les cellules intestinales capables d'interférer avec chacune de ces fonctions.

Escherichia entéropathogène et ses facteurs de virulence

Escherichia coli entéropathogène (EPEC) infecte l'intestin grêle causant des diarrhées aqueuses sévères chez l'homme et la mort de milliers d'enfants chaque année dans les pays en voie de développement [2]. Ce pathogène induit la formation de lésions intestinales caractéristiques de la famille des « Attaching and Effacing » (A/E). Les pathogènes A/E détruisent les microvilli absorbantes et adhèrent intimement à l'épithélium intestinal en formant un piédestal riche en actine sous la bactérie adhérente [2, 47].

Le déclenchement de la maladie nécessite la colonisation de l'intestin, l'échappement au système immunitaire, l'effacement des microvilli et la destruction de la barrière intestinale. Le plasmide « encoded adhesion factors » (pEAF) code les pili de type IV permettant de coloniser le tractus intestinal et le locus LEE (Locus of Enterocyte Effacement) code l'appareil de sécrétion de type III et les effecteurs permettant la formation des lésions A/E et la subversion des fonctions normales de la cellule intestinale [40, 48]. Le LEE est essentiel dans la pathogénèse d'EPEC menant à la diarrhée ; cependant les effecteurs codés en dehors du LEE (Nle pour « non-LEE encoded ») joueraient un rôle dans la colonisation [47, 49] et conféraient à EPEC la capacité d'inhiber la réaction inflammatoire de l'hôte [50]. Le séquençage récent d'EPEC a permis de déterminer la présence de six autres PAI codants 21 effecteurs [51].

1. Le locus LEE

Le Locus of Enterocyte Effacement (LEE) est l'un des plus importants locus identifié. Il est non seulement indispensable dans le processus d'infection mais il est également capable de conférer à un *E.coli* non pathogène l'aptitude d'induire des lésions « Attaching and Effacing » [52, 53].

Le LEE code les gènes régulateurs (activateurs et répresseurs) des gènes de virulence [54], les protéines impliquées dans la formation de l'appareil sécrétoire de type III (TTSS), la protéine membranaire extracellulaire appelée Intimin, six effecteurs et deux chaperonnes [47]. L'organisation du LEE en cinq opérons permet de mettre en valeur l'importance des gènes impliqués dans l'appareil de type III qui représentent plus de 40% des gènes de ce PAI.

1.1 L'appareil sécrétoire de type III d'EPEC

Le T3SS d'EPEC est un complexe d'une vingtaine de protéines qui permet l'injection de facteurs de virulence dans le cytoplasme des cellules intestinales. Un corps basal apparenté à celui des flagelles est ancré dans la paroi des bactéries et se prolonge par un filament rigide. Ce filament, formé par la polymérisation de la protéine espA, permet la sécrétion des translocateurs espB et espD qui forment un pore dans la membrane de la cellule hôte [55, 56]. EspB est également injecté dans le cytoplasme de la cellule hôte et faciliterait l'effacement des microvilli et l'inhibition de la phagocytose [57].

La translocation des effecteurs nécessite une séquence signal N-terminal et/ou des chaperonnes qui dirigent les effecteurs vers l'appareil de sécrétion [58, 59]. EPEC code deux chaperonnes cesT et cesF (Chaperonne EPEC Secreted). CesT facilite la translocation de plusieurs effecteurs dont Tir (Translocated Intimin Receptor), Map (Mitochondrial Associated Protein), espH, espZ et NleA (Non-LEE A) [60, 61] tandis que cesF facilite la translocation d'espF [62].

Les substrats de l'appareil de type III sont nombreux et à présent 21 effecteurs ont été identifiés chez EPEC [51]. Ces effecteurs ciblent divers organelles et sont responsables du déclenchement de la maladie.

1.2 Les Effecteurs du LEE

Le LEE code six protéines injectées par le T3SS et une protéine membranaire appelée Intimin. Tir, Map et espF ont été intensivement étudiés et sont des molécules multifonctionnelles impliquées dans diverses fonctions de la cellule hôte. Les effecteurs espG, espH et espZ ont été moins étudiés et leurs rôles restent à déterminer.

Tir est essentiel dans le processus du développement de la maladie. L'insertion de cet effecteur dans la membrane cytoplasmique des cellules intestinales permet d'interagir avec son ligand Intimin afin d'adhérer intimement à la cellule hôte [63]. De plus, l'interaction Tir-Intimin déclenche divers signaux à travers la cellule hôte menant à la formation de piédestaux riches en actine sous les bactéries adhérentes [63] et à l'enfouissement des bactéries dans les microvilli de la bordure en brosse des entérocytes [64].

Map et EspF sont des protéines multifonctionnelles qui ciblent les mitochondries et induisent la destruction des jonctions serrées, l'effacement des microvilli et l'inhibition de la pompe à sodium/glucose SGLT-1 [64-67]. Ces effecteurs possèdent également des activités non mitochondriales telles que le réarrangement du cytosquelette cdc42-dépendent induit par Map [68] et l'inhibition de la phagocytose des bactéries par espF [69].

EspG et son homologue espG2 (ou orf3) jouent un rôle dans la destruction des microtubules et des jonctions serrées, et l'activation des calpaïnes qui clivent les protéines du cytosquelette pour « décoller » les cellules [70-72].

EspH réprime la formation de filopodes, favorise la formation des piédestaux riches en actine [73] et joue un rôle mineur dans l'inhibition de la phagocytose [74].

EspZ interagirait avec la protéine hôte CD98 afin de retarder les effets toxiques au cours d'une infection avec EPEC [75].

L'une des caractéristiques émergentes des effecteurs du LEE est leur capacité d'interagir entre eux de manière synergétique, antagoniste ou redondante. En effet la coopération de Map, EspF et Intimin permet de déstabiliser les fonctions de la barrière intestinale en agissant sur les jonctions serrées [67] et la coopération de Map, EspF, Tir et Intimin entraîne l'effacement des microvilli [64]. De plus, Tir joue un rôle protecteur en inhibant l'activation des calpaïnes induite par espG et Orf3 afin de limiter le détachement des cellules de la barrière intestinale [72] et régule négativement en coopération avec espH la formation de filopodes induite par Map [73, 76].

2. Le plasmide pEAF

EPEC possède un large plasmide pEAF (plasmid for EPEC adherence factor) qui code un opéron dédié à la production de BFP (Bundle-Forming-Pili), et un second opéron *per* (plasmid encoded regulator) dédié à l'activation des gènes du LEE et du gène *bfp* [77].

BFP est un pili de type IV qui confère à EPEC une adhérence locale caractérisée par la formation de micro-colonies à la surface des cellules épithéliales [78]. Des études effectuées sur des volontaires indiquent que BFP est un facteur essentiel dans la colonisation de l'intestin ; en effet une mutation au niveau de ce pili rend EPEC non-virulent [79].

Per régule positivement l'expression du gène *ler* de l'opéron *LEE1* qui active l'expression des gènes codés des opérons *LEE2*, *LEE3*, et *LEE4* [77]. Le *Ler* est également activé par le Global Regulator *Ler* Activator (GlrA) et réprimé par le Global Regulator *Ler* Repressor (GlrR) [54, 80].

3 Les loci de pathogénèse Non-LEE

Le séquençage récent d'EPEC a permis de déterminer la présence de six autres loci intacts codant 14 effecteurs [51]. La découverte des effecteurs codés en dehors du LEE est relativement récente et un phénotype a été attribué pour cinq effecteurs seulement : NleA, NleB, NleE, NleF et NleH.

NleA jouerait un rôle dans la destruction des jonctions serrées de l'épithélium intestinal [81] et NleH avec son activité anti-apoptotique favoriserait la survie des cellules intestinales [82]. NleB et NleF sont associés à la colonisation de l'intestin de souris infectées avec *Citrobacter rodentium* [83, 84]. De plus, NleB augmenterait l'activité de NleE dans l'inhibition du facteur de transcription NF_Β, élément central activateur

de la réponse immunitaire innée [85]. Des études précédentes ont montré qu'EPEC est capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF_Β et suggéraient un rôle des effecteurs Non-LEE [45].

En plus de ces effecteurs, EPEC code une toxine auto-sécrétée appelée espC associée à la résistance lysosomique [86] et une adhésine afimbrial LifA (« lymphocyte inhibitory factor ») jouant également le rôle de lymphotoxine [87, 88]. EspC, injectée dans les cellules épithéliales par le T3SS [89], cible et clive la protéine fodrine, associée au cytosquelette. EspC n'interviendrait pas dans la formation des lésions A/E ou la formation de piédestaux et son rôle dans la pathogénèse d'EPEC est inconnu [86, 90].

4. Autres facteurs de virulence

BFP joue un rôle essentiel dans la colonisation, cependant EPEC code diverses adhésines dont Intimin et LifA. Le séquençage du chromosome d'EPEC a permis de mettre en évidence la présence de huit opérons intacts codant des adhésines de type fimbriae, six systèmes de fixation du fer afin de faciliter la survie, et un appareil de sécrétion de type II [51], cependant les substrats sont inconnus actuellement.

5. Conclusion

La pathogénèse d'EPEC fait intervenir de nombreux facteurs de virulence codés sur sept PAI et un plasmide. Les pili de type IV BFP, codés par le plasmide pEAF, sont essentiels dans la colonisation de l'hôte [79], cependant le mécanisme aboutissant à la diarrhée est méconnu.

Le LEE est le premier locus découvert et est sans doute l'un des plus importants. Il confère à une souche non pathogène la capacité d'induire les lésions caractéristiques de la famille des pathogènes A/E (« Attaching/Effacing ») caractérisées par un attachement intime à l'épithélium intestinale et l'effacement des microvilli [52]. Le LEE code un appareil de type III permettant la translocation d'effecteurs dans la cellule hôte et les effecteurs (dont Tir, Map et espF) capables de subvertir les fonctions normales de la cellule hôte. Le LEE code également une adhésine appelée Intimin qui interagit avec son ligand Tir (« Translocated Intimin Receptor ». Tir et Intimin sont également des facteurs essentiels dans la virulence d'EPEC. En effet des études in vivo effectués chez la souris avec *Citrobacter rodentium* indiquent que leur rôle est essentiel dans la colonisation de l'intestin [53]. Les effecteurs injectés dans la cellule hôte ciblent divers organelles dont les mitochondries, le nucléole et les jonctions serrées pour perturber leurs fonctions. Ces effecteurs sont souvent des protéines multifonctionnelles capables d'interagir entre eux de manière synergétique, antagonistes ou redondantes.

Six autres PAI codant quatorze effecteurs ont également un rôle dans la pathogénèse d'EPEC. Ces effecteurs ont été beaucoup moins étudiés, cependant des études récentes précisent leur rôle dans divers procédés biologiques dont la colonisation de l'hôte et l'inhibition de la réaction inflammatoire [83-85].

Escherichia entéro-pathogène et déclenchement de la diarrhée

L'épithélium de l'intestin grêle est composé de quatre lignées cellulaires provenant d'une cellule pluripotente. Les entérocytes sont les cellules intestinales les plus abondantes et jouent un rôle essentiel dans les phénomènes d'absorption et de sécrétion. Ces cellules assurent également la perméabilité de l'épithélium en formant entre elle des complexes appelés les jonctions serrées. Les cellules à gobelet, entéro-endocrines et de Paneth permettent de protéger l'organisme en sécrétant respectivement des mucines (formant alors un mucus), des hormones telles que la sérotonine et des peptides antimicrobiens tels que la défensine- [91-95]. Des régions spécialisées de l'intestin grêle appelées les plaques de Peyer sont présentes dans la sous-muqueuse de l'intestin grêle et contiennent des agrégats de follicules lymphoïdes. L'épithélium associé à ces plaques contient également des cellules M qui jouent un rôle essentiel dans l'immunité des muqueuses en permettant la transcytose d'antigènes et de pathogènes vers ces tissus lymphoïdes. Les cellules dendritiques peuvent alors internaliser ces éléments étrangers et présenter des peptides antigéniques aux cellules immunitaires pour induire une réaction immunitaire ou de tolérance [96, 97].

L'épithélium intestinal forme ainsi une barrière physique imperméable capable d'absorber les nutriments et de protéger l'organisme contre les agents pathogènes présents dans le lumen. L'épithélium intestinal est colonisé par une flore commensale qui joue un rôle bénéfique et essentiel dans la digestion et l'apport de vitamines. Cette barrière intestinale est donc en homéostasie permanente entre la tolérance et l'immunité [91]. Le facteur de transcription NF- κ B est essentiel dans le maintien de ce balance immunitaire et permet d'induire une réponse immunitaire afin d'éliminer les organismes étrangers [98].

EPEC colonise et injecte des effecteurs dans les cellules intestinales pour subvertir leurs fonctions et induire la maladie. Le déclenchement de la diarrhée par EPEC implique la colonisation intestinale, l'injection d'effecteurs dans les cellules intestinales, l'échappement au système immunitaire permettant la survie du pathogène et la disruption des mécanismes de sécrétion et d'absorption de l'épithélium intestinal.

1. Echappement au système immunitaire

La réponse immunitaire innée ou inflammatoire est la première ligne de défense contre les organismes étrangers. Les cellules épithéliales et immunitaires expriment à la surface des récepteurs appelés « Pattern

Recognition Receptor » (PRR) capables de reconnaître des motifs spécifiques microbiens appelés « Pathogen Associated Molecular Pattern » (PAMP) et d'induire une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de facteurs de transcription pour induire une immunité. Des études indiquent qu'EPEC est capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF- κ B, élément central de la réponse immunitaire innée et du maintien de l'homéostasie immunitaire, capable d'induire une cascade de signalisation menant à la production de cytokines, de chemokines et d'enzymes inductibles [99, 100]. Plus spécifiquement EPEC inhibe l'induction de l'iNOS (inducible Nitric Oxide Synthétase) et la production d'interleukine-8 (IL-8) [50]. L'iNOS est une enzyme produisant de l'oxyde nitrique, un antimicrobien efficace contre les bactéries adhérentes alors que l'IL-8 est une chemokine inflammatoire qui permet le recrutement de cellules immunitaires telles que les macrophages sur le site d'infection [101].

EPEC est également capable d'inhiber la transcytose par les cellules M et la phagocytose par les macrophages. La phagocytose est définie comme l'internalisation de molécules de taille supérieure à 0.5 μ m par des cellules spécialisées telles que les macrophages et les cellules dendritiques capables de présenter des antigènes aux cellules immunitaires et d'induire la production de cytokines inflammatoires pour activer la réponse immunitaire adaptative [102-104]. La phagocytose est un processus qui nécessite une interaction entre la molécule à internaliser et un récepteur des cellules phagocytaires pour induire le remodelage du cytosquelette d'actine aboutissant à la formation des coupes phagocytaires et de pseudopodes. La formation et la maturation des phagosomes nécessitent la fusion membranaire et le trafic vésiculaire pour former un phagolysosome où les éléments étrangers sont dégradés [103, 105, 106]. La kinase PI3 joue un rôle essentiel dans le mécanisme de la phagocytose et régulerait la fermeture du phagosome et le trafic membranaire [104, 107]. EPEC inhibe la voie PI 3-kinase (phosphatidylinositol), la formation des coupes phagocytaires en interférant avec l'interaction actine-myosine, et interfère avec la dynamique du cytosquelette au cours de l'internalisation [44, 57]. Les effecteurs espF, espB et espH respectivement sont responsables de l'inhibition de la phagocytose [57, 69]. Un effecteur non-LEE, espJ inhiberait en plus l'opsonisation de particules par les récepteurs Fc γ R et CR3 (« complément receptor ») [108]. De plus, espB en interférant avec la myosine impliquée dans la formation des microvilli, contribuerait également à l'effacement des microvilli.

2. Déstabilisation de l'homéostasie de l'épithélium

La perméabilité de l'épithélium est maintenue par la formation de jonctions serrées entre les cellules intestinales et implique la polarisation de ces cellules ayant une composition différente entre la membrane apicale formée de microvillosités absorbantes appelées microvilli et la membrane basale [109]. La membrane apicale contient plusieurs pompes et transporteurs qui permettent le transport spécifique d'électrolytes et de molécules d'eau. La perturbation de la perméabilité de l'épithélium et la perturbation des mécanismes d'absorption et de sécrétion d'électrolytes sont des facteurs contribuant à la diarrhée.

2.1 Déstabilisation des jonctions serrées

Les jonctions serrées forment des complexes composés de protéines transmembranaires, cytoplasmiques et de signalisation. Les protéines transmembranaires occludines, claudines et JAMs (IgG like family of Junctional Adhesion Molecules) permettent l'adhésion entre les cellules intestinales alors que les protéines cytoplasmiques zonula occludens (ZO) stabilisent les jonctions en formant un réseau entre les protéines transmembranaires et le cytosquelette [110].

EPEC utilise plusieurs stratégies afin de perturber la perméabilité de l'épithélium [40, 111]:

- la déstabilisation des jonctions serrées en agissant au niveau du cytosquelette et au niveau de la formation des jonctions permettant l'ouverture de ces jonctions et ainsi le passage de fluides.
- la destruction de l'intégrité de l'épithélium en induisant le détachement des cellules épithéliales.

Le cytosquelette permet de stabiliser les jonctions serrées, cependant EPEC phosphoryle les MLC (Myosine Light Chain) induisant la contraction du cytosquelette et ainsi l'ouverture des jonctions serrées. Le mécanisme impliqué dans la phosphorylation des MLC reste inconnu cependant EPEC stimule la libération intracellulaire de calcium et l'accumulation de complexes Ca^{2+} -calmoduline capable d'activer les MLCK [112].

EPEC interfère avec l'intégrité des jonctions serrées en induisant la phosphorylation et ainsi la dissociation de la protéine occludine impliquée dans la formation des jonctions serrées [113]. Ce phénotype est associé à la coopération des effecteurs Map et espF [67].

EPEC détruit également l'intégrité de l'épithélium en induisant le détachement des cellules via l'activation de protéases, les calpaïnes. EspG et son homologue Orf3 jouent un rôle mineur dans l'augmentation de la perméabilité [71], cependant cette activité est en partie inhibée par Tir qui joue un rôle protecteur [111].

2.2 Inhibition des mécanismes d'absorption et de sécrétion d'électrolytes

L'épithélium intestinal est en continuelle homéostasie entre la sécrétion et l'absorption d'électrolytes pour former un gradient osmotique permettant le passage de fluides. La sécrétion de fluides permettrait également de former un environnement plus favorable à la digestion enzymatique et faciliterait ainsi l'absorption des nutriments [114]. Le gradient osmotique est maintenu par la présence de transporteurs présents dans la membrane apicale et basale des cellules intestinales permettant le transport d'ions chlorures et sodiums. Le mécanisme par lequel EPEC induit la diarrhée implique l'inhibition de l'absorption des ions Na^{+} et Cl^{-} , et l'activation de la sécrétion d'ions Cl^{-} aboutissant à l'accumulation et à la sécrétion de fluides dans le lumen [40].

L'absorption est inhibée par trois mécanismes :

- l'inhibition de l'échangeur Na⁺/H⁺ (NHE3)
- l'inhibition de l'échangeur Cl⁻/OH⁻ (DRA) permettant le maintien de l'électro-neutralité
- l'inhibition du co-transporteur glucose/Na⁺ permettant l'absorption jusqu'à 6L d'eau par jour (SGLT1).

EspF est un effecteur multifonctionnel impliqué dans l'inhibition des jonctions serrées mais également dans l'inhibition de NHE3, cependant le mécanisme est inconnu [115]. EspG et Orf3 déstabilisent les microtubules ce qui induit une redistribution de l'échangeur DRA de la membrane apicale vers des compartiments intracellulaires et induisent ainsi l'inhibition de l'absorption par cet échangeur [116]. SGLT1 est inhibé par la destruction des microvilli absorbants contenant ce transporteur et par l'activité des effecteurs EspF, Map, Tir, et la protéine extracellulaire Intimin [64].

3. Conclusion

Au cours de l'évolution le transfert horizontal d'éléments génétiques aurait permis à une souche commensale *E.coli* d'acquérir des loci de pathogénèse (PAI) codants des facteurs de virulence et de devenir ainsi pathogène. EPEC sécrète directement dans les cellules intestinales une multitude d'effecteurs capables de cibler divers organelles et d'interagir entre eux de manière synergétique, antagoniste ou redondante afin de favoriser la colonisation intestinale et de déstabiliser les fonctions normales de la barrière intestinale dont l'immunité, la perméabilité de l'épithélium, la sécrétion et l'absorption d'électrolytes pour induire une diarrhée de type aqueuse.

La colonisation est favorisée par l'expression de pili de type IV (BFP) et l'interaction du ligand Intimin avec son récepteur Tir. Cette interaction induit également une cascade signalétique aboutissant à la formation de piédestaux riches en actine sous les bactéries adhérentes. Les effecteurs possèdent des homologies structurales et fonctionnelles avec les protéines eucaryotes et sont ainsi capables d'interférer avec les fonctions normales des cellules intestinales. Ainsi EPEC échappe au système immunitaire en inhibant son internalisation par les cellules M et les cellules phagocytaires et en inhibant le déclenchement de la réaction inflammatoire en interférant avec l'activation, la translocation et la transcription du facteur de transcription NF- κ B. Plusieurs effecteurs ciblent les jonctions serrées et les transporteurs intestinaux afin de perturber la perméabilité de l'épithélium et d'inhiber l'absorption d'électrolytes et de molécules d'eau contribuant ainsi au déclenchement de la diarrhée.

Le mécanisme d'EPEC permettant l'échappement au système immunitaire, et plus précisément l'inhibition de la réaction inflammatoire, est l'un des aspects qui nous intéresse. L'identification des loci de pathogénèse et des effecteurs responsables de l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B est donc indispensable.

Le projet de recherche : identification des effecteurs inhibant la réaction inflammatoire

1. Le but du projet

Le mécanisme d'infection d'EPEC est complexe et nécessite l'injection de nombreux facteurs de virulence dans les cellules intestinales pour induire la maladie. Les effecteurs du LEE sont essentiels dans ce processus et contribuent à la diarrhée en subvertissant les fonctions normales de la cellule intestinale dont la disruption des jonctions serrées, l'effacement des microvilli et l'inactivation de la pompe majeure intestinale

absorptive SGLT-1 [47, 64, 67]. Toutefois la capacité d'EPEC à coloniser l'intestin et à survivre dans cet environnement implique des effecteurs codés en dehors du LEE. Des études indiquent qu'EPEC est capable d'échapper au système immunitaire en inhibant la réponse immunitaire innée et les effecteurs impliqués seraient codés en dehors du LEE [50].

EPEC est capable d'inhiber l'activation du facteur de transcription NF- κ B, élément central de la réponse immunitaire cependant son mécanisme est inconnu [45]. L'activation des PRRs avec des PAMPs induit une cascade de signalisation aboutissant à l'activation de NF- κ B. Cette cascade de signalisation implique la phosphorylation de la kinase IKK qui elle-même phosphoryle I κ B, l'inhibiteur de NF- κ B. I κ B forme un complexe avec NF- κ B pour empêcher la translocation de ce facteur de transcription dans le noyau nucléaire. La phosphorylation d'I κ B induit son ubiquitination et sa dégradation par le protéasome, libérant ainsi NF- κ B qui peut ainsi migrer dans le noyau pour activer la transcription de gènes jouant un rôle dans la réponse inflammatoire [117].

Des études dans le laboratoire se sont focalisées dans la découverte des gènes impliqués dans l'inhibition du facteur de transcription NF- κ B et de la production d'IL-8. La première stratégie a été de déterminer l'implication des effecteurs du LEE et une série de délétions (Tir, Map, espF, espH, espZ et espG) ont été créés afin de tester la capacité des mutants à inhiber ou non la production d'IL-8. Les résultats de cette étude indiquent que les effecteurs du LEE ne jouent pas un rôle dans cette inhibition et impliquent le rôle des effecteurs codés en dehors du LEE [45].

Le but du projet est donc de déterminer le ou les effecteurs (codés en dehors du LEE) capables d'inhiber la réaction inflammatoire et la production d'IL-8 afin de déterminer le mécanisme d'EPEC pour échapper au système immunitaire. A présent quatorze effecteurs codés sur six PAI ont été identifiés et sont potentiellement impliqués dans ce phénotype. L'une des stratégies utilisée consiste à générer la délétion de chaque PAI par échange allélique dans le chromosome d'EPEC et de tester la capacité de ces mutants à inhiber la production d'IL-8. La délétion individuelle des effecteurs de chaque PAI impliqué dans cette inhibition permettra de déterminer la contribution de chaque effecteur et leur mécanisme.

2. Les stratégies utilisées

La stratégie initiale du projet était de transformer une souche *E.coli* non pathogène capable d'exprimer l'appareil sécrétoire de type III d'EPEC. Cette souche non pathogène permettrait l'injection d'effecteurs codés par un plasmide afin de déterminer leur capacité à inhiber la sécrétion d'IL-8.

Les effecteurs injectés par l'appareil de sécrétion de type III (T3SS) sont des molécules multifonctionnelles pouvant coopérer de manière synergétique, antagoniste ou redondante. C'est pourquoi la génération d'une souche d'*E. coli* non pathogène capable de former l'appareil sécrétoire de type III d'EPEC a été la stratégie choisie. L'utilisation d'une souche non-EPEC limite les interactions entre les effecteurs LEE et non-LEE et permet d'étudier uniquement l'activité des effecteurs de chaque PAI codés par un plasmide.

Le clonage des gènes impliqués dans l'appareil sécrétoire dans un chromosome artificiel bactérien (BAC) devrait permettre à cette souche d'injecter des effecteurs de virulence codés par un plasmide. Cependant cette stratégie a dû être abandonnée par l'inefficacité de cette souche à exprimer et à sécréter les molécules de l'appareil de sécrétion. Le LEE a été également cloné dans le chromosome de MG1655, malheureusement cette stratégie n'a pas permis d'obtenir des niveaux d'expression et de sécrétion suffisants.

La deuxième stratégie est donc de générer la délétion des six loci non-LEE dans le chromosome d'EPEC et de tester leur capacité à inhiber la réaction inflammatoire et la production d'IL-8. Le génome d'EPEC est séquencé et des analyses bioinformatiques ont permis de mettre en évidence six PAI codant 14 effecteurs [51]. La totalité de chaque PAI a été muté et implique la délétion de régions chromosomiques de 25 à 60Kb par échange allélique. Le clonage des effecteurs dans des plasmides d'expression va permettre de compléter les mutants défectueux afin de confirmer leur rôle.

Références

1. Donnenberg, M.S. and T.S. Whittam, *Pathogenesis and evolution of virulence in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*. J Clin Invest, 2001. **107**(5): p. 539-48.
 2. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
 3. Lawrence, J.G. and H. Ochman, *Molecular archaeology of the Escherichia coli genome*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(16): p. 9413-7.
 4. Gal-Mor, O. and B.B. Finlay, *Pathogenicity islands: a molecular toolbox for bacterial virulence*. Cell Microbiol, 2006. **8**(11): p. 1707-19.
 5. Hacker, J. and J.B. Kaper, *Pathogenicity islands and the evolution of microbes*. Annu Rev Microbiol, 2000. **54**: p. 641-79.
 6. Finlay, B.B. and S. Falkow, *Common themes in microbial pathogenicity revisited*. Microbiol Mol Biol Rev, 1997. **61**(2): p. 136-69.
 7. Schmidt, H. and M. Hensel, *Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis*. Clin Microbiol Rev, 2004. **17**(1): p. 14-56.
 8. Wandersman, C. and P. Delepelaire, *Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores*. Annu Rev Microbiol, 2004. **58**: p. 611-47.
 9. Fronzes, R., H. Remaut, and G. Waksman, *Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria*. EMBO J, 2008. **27**(17): p. 2271-80.
 10. Hahn, E., P. Wild, U. Hermanns, P. Sebbel, R. Glockshuber, M. Haner, N. Taschner, P. Burkhard, U. Aebi, and S.A. Muller, *Exploring the 3D molecular architecture of Escherichia coli type 1 pili*. J Mol Biol, 2002. **323**(5): p. 845-57.
-

11. Gerlach, R.G. and M. Hensel, *Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens*. Int J Med Microbiol, 2007. **297**(6): p. 401-15.
12. Connell, I., W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Marild, and C. Svanborg, *Type I fimbrial expression enhances Escherichia coli virulence for the urinary tract*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(18): p. 9827-32.
13. Proft, T. and E.N. Baker, *Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria - structure, assembly and their role in disease*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(4): p. 613-35.
14. Barnhart, M.M. and M.R. Chapman, *Curli biogenesis and function*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 131-47.
15. Gophna, U., M. Barlev, R. Seiffers, T.A. Oelschlager, J. Hacker, and E.Z. Ron, *Curli fibers mediate internalization of Escherichia coli by eukaryotic cells*. Infect Immun, 2001. **69**(4): p. 2659-65.
16. Stathopoulos, C., D.R. Hendrixson, D.G. Thanassi, S.J. Hultgren, J.W. St Geme, 3rd, and R. Curtiss, 3rd, *Secretion of virulence determinants by the general secretory pathway in gram-negative pathogens: an evolving story*. Microbes Infect, 2000. **2**(9): p. 1061-72.
17. Peabody, C.R., Y.J. Chung, M.R. Yen, D. Vidal-Ingigliardi, A.P. Pugsley, and M.H. Saier, Jr., *Type II protein secretion and its relationship to bacterial type IV pili and archaeal flagella*. Microbiology, 2003. **149**(Pt 11): p. 3051-72.
18. Cotter, S.E., N.K. Surana, and J.W. St Geme, 3rd, *Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins*. Trends Microbiol, 2005. **13**(5): p. 199-205.
19. Feingold, D.S., *Bacterial adherence, colonization, and pathogenicity*. Arch Dermatol, 1986. **122**(2): p. 161-3.
20. Rego, A.T., V. Chandran, and G. Waksman, *Two-step and one-step secretion mechanisms in Gram-negative bacteria: contrasting the type IV secretion system and the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis*. Biochem J. **425**(3): p. 475-88.
21. Rigel, N.W. and M. Braunstein, *A new twist on an old pathway--accessory Sec [corrected] systems*. Mol Microbiol, 2008. **69**(2): p. 291-302.
22. Natale, P., T. Bruser, and A.J. Driessen, *Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane--distinct translocases and mechanisms*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(9): p. 1735-56.
23. Lee, P.A., D. Tullman-Ercek, and G. Georgiou, *The bacterial twin-arginine translocation pathway*. Annu Rev Microbiol, 2006. **60**: p. 373-95.
24. Cianciotto, N.P., *Type II secretion: a protein secretion system for all seasons*. Trends Microbiol, 2005. **13**(12): p. 581-8.
25. Henderson, I.R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R.C. Fernandez, and D. Ala'Aldeen, *Type V protein secretion pathway: the autotransporter story*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(4): p. 692-744.
26. Thanassi, D.G., E.T. Saulino, and S.J. Hultgren, *The chaperone/usher pathway: a major terminal branch of the general secretory pathway*. Curr Opin Microbiol, 1998. **1**(2): p. 223-31.
27. Marlovits, T.C. and C.E. Stebbins, *Type III secretion systems shape up as they ship out*. Curr Opin Microbiol. **13**(1): p. 47-52.
28. Coburn, B., I. Sekirov, and B.B. Finlay, *Type III secretion systems and disease*. Clin Microbiol Rev, 2007. **20**(4): p. 535-49.
29. Christie, P.J., K. Atmakuri, V. Krishnamoorthy, S. Jakubowski, and E. Cascales, *Biogenesis, architecture, and function of bacterial type IV secretion systems*. Annu Rev Microbiol, 2005. **59**: p. 451-85.
30. Ding, Z., K. Atmakuri, and P.J. Christie, *The outs and ins of bacterial type IV secretion substrates*. Trends Microbiol, 2003. **11**(11): p. 527-35.
31. Filloux, A., A. Hachani, and S. Bleves, *The bacterial type VI secretion machine: yet another player for protein transport across membranes*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 6): p. 1570-83.
32. Pukatzki, S., S.B. McAuley, and S.T. Miyata, *The type VI secretion system: translocation of effectors and effector-domains*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(1): p. 11-7.
33. Cascales, E., *The type VI secretion toolkit*. EMBO Rep, 2008. **9**(8): p. 735-41.
34. F.C.Neidhart, R.C., J.L.Ingraham, E.C.C.Lin, K.B.Low, B.Magasanik, W.S.Reznikioff, M.Riley, M.Schaechter, H.E.Umbarger, ed. *Protein toxins of Escherichia coli and Salmonella. Escherichia coli and Salmonella*. Vol. 2. 1996. 2788-2802.

35. Sears, C.L. and J.B. Kaper, *Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion*. Microbiol Rev, 1996. **60**(1): p. 167-215.
36. Mattoo, S., Y.M. Lee, and J.E. Dixon, *Interactions of bacterial effector proteins with host proteins*. Curr Opin Immunol, 2007. **19**(4): p. 392-401.
37. Mota, L.J. and G.R. Cornelis, *The bacterial injection kit: type III secretion systems*. Ann Med, 2005. **37**(4): p. 234-49.
38. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
39. Rubinoff, M.J. and M. Field, *Infectious diarrhea*. Annu Rev Med, 1991. **42**: p. 403-10.
40. Viswanathan, V.K., K. Hodges, and G. Hecht, *Enteric infection meets intestinal function: how bacterial pathogens cause diarrhoea*. Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(2): p. 110-9.
41. Clarke, S.C., *Diarrhoeagenic Escherichia coli--an emerging problem?* Diagn Microbiol Infect Dis, 2001. **41**(3): p. 93-8.
42. Turner, S.M., A. Scott-Tucker, L.M. Cooper, and I.R. Henderson, *Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **263**(1): p. 10-20.
43. Chen, H.D. and G. Frankel, *Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis*. FEMS Microbiol Rev, 2005. **29**(1): p. 83-98.
44. Celli, J., M. Olivier, and B.B. Finlay, *Enteropathogenic Escherichia coli mediates antiphagocytosis through the inhibition of PI 3-kinase-dependent pathways*. Embo J, 2001. **20**(6): p. 1245-58.
45. Ruchaud-Sparagano, M.H., M. Maresca, and B. Kenny, *Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) inactivate innate immune responses prior to compromising epithelial barrier function*. Cell Microbiol, 2007. **9**(8): p. 1909-21.
46. Kunzelmann, K. and B. McMorran, *First encounter: how pathogens compromise epithelial transport*. Physiology (Bethesda), 2004. **19**: p. 240-4.
47. Dean, P., M. Maresca, and B. Kenny, *EPEC's weapons of mass subversion*. Curr Opin Microbiol, 2005. **8**(1): p. 28-34.
48. Dean, P. and B. Kenny, *The effector repertoire of enteropathogenic E. coli: ganging up on the host cell*. Curr Opin Microbiol, 2009. **12**(1): p. 101-9.
49. Spears, K.J., A.J. Roe, and D.L. Gally, *A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli pathogenesis*. FEMS Microbiol Lett, 2006. **255**(2): p. 187-202.
50. Maresca, M., D. Miller, S. Quitard, P. Dean, and B. Kenny, *Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) effector-mediated suppression of antimicrobial nitric oxide production in a small intestinal epithelial model system*. Cell Microbiol, 2005. **7**(12): p. 1749-62.
51. Iguchi, A., N.R. Thomson, Y. Ogura, D. Saunders, T. Ooka, I.R. Henderson, D. Harris, M. Asadulghani, K. Kurokawa, P. Dean, B. Kenny, M.A. Quail, S. Thurston, G. Dougan, T. Hayashi, J. Parkhill, and G. Frankel, *Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 strain E2348/69*. J Bacteriol, 2009. **191**(1): p. 347-54.
52. McDaniel, T.K. and J.B. Kaper, *A cloned pathogenicity island from enteropathogenic Escherichia coli confers the attaching and effacing phenotype on E. coli K-12*. Mol Microbiol, 1997. **23**(2): p. 399-407.
53. Deng, W., B.A. Vallance, Y. Li, J.L. Puente, and B.B. Finlay, *Citrobacter rodentium translocated intimin receptor (Tir) is an essential virulence factor needed for actin condensation, intestinal colonization and colonic hyperplasia in mice*. Mol Microbiol, 2003. **48**(1): p. 95-115.
54. Deng, W., J.L. Puente, S. Gruenheid, Y. Li, B.A. Vallance, A. Vazquez, J. Barba, J.A. Ibarra, P. O'Donnell, P. Metalnikov, K. Ashman, S. Lee, D. Goode, T. Pawson, and B.B. Finlay, *Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(10): p. 3597-602.
55. Tampakaki, A.P., V.E. Fadoulglou, A.D. Gazi, N.J. Panopoulos, and M. Kokkinidis, *Conserved features of type III secretion*. Cell Microbiol, 2004. **6**(9): p. 805-16.
56. Cornelis, G.R., *The type III secretion injectisome*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(11): p. 811-25.

57. Iizumi, Y., H. Sagara, Y. Kabe, M. Azuma, K. Kume, M. Ogawa, T. Nagai, P.G. Gillespie, C. Sasakawa, and H. Handa, *The enteropathogenic E. coli effector EspB facilitates microvillus effacing and antiphagocytosis by inhibiting myosin function*. Cell Host Microbe, 2007. **2**(6): p. 383-92.
58. Aldridge, P. and K.T. Hughes, *How and when are substrates selected for type III secretion?* Trends Microbiol, 2001. **9**(5): p. 209-14.
59. Ghosh, P., *Process of protein transport by the type III secretion system*. Microbiol Mol Biol Rev, 2004. **68**(4): p. 771-95.
60. Thomas, N.A., W. Deng, J.L. Puente, E.A. Frey, C.K. Yip, N.C. Strynadka, and B.B. Finlay, *CesT is a multi-effector chaperone and recruitment factor required for the efficient type III secretion of both LEE- and non-LEE-encoded effectors of enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2005. **57**(6): p. 1762-79.
61. Mills, E., K. Baruch, X. Charpentier, S. Kobi, and I. Rosenshine, *Real-time analysis of effector translocation by the type III secretion system of enteropathogenic Escherichia coli*. Cell Host Microbe, 2008. **3**(2): p. 104-13.
62. Elliott, S.J., C.B. O'Connell, A. Koutsouris, C. Brinkley, M.S. Donnenberg, G. Hecht, and J.B. Kaper, *A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic Escherichia coli to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF*. Infect Immun, 2002. **70**(5): p. 2271-7.
63. Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D.J. Reinscheid, E.A. Frey, and B.B. Finlay, *Enteropathogenic E. coli (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells*. Cell, 1997. **91**(4): p. 511-20.
64. Dean, P., M. Maresca, S. Schuller, A.D. Phillips, and B. Kenny, *Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic Escherichia coli-injected effector proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(6): p. 1876-81.
65. Kenny, B. and M. Jepson, *Targeting of an enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) effector protein to host mitochondria*. Cell Microbiol, 2000. **2**(6): p. 579-90.
66. Nagai, T., A. Abe, and C. Sasakawa, *Targeting of enteropathogenic Escherichia coli EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF*. J Biol Chem, 2005. **280**(4): p. 2998-3011.
67. Dean, P. and B. Kenny, *Intestinal barrier dysfunction by enteropathogenic Escherichia coli is mediated by two effector molecules and a bacterial surface protein*. Mol Microbiol, 2004. **54**(3): p. 665-75.
68. Kenny, B., S. Ellis, A.D. Leard, J. Warawa, H. Mellor, and M.A. Jepson, *Co-ordinate regulation of distinct host cell signalling pathways by multifunctional enteropathogenic Escherichia coli effector molecules*. Mol Microbiol, 2002. **44**(4): p. 1095-1107.
69. Quitard, S., P. Dean, M. Maresca, and B. Kenny, *The enteropathogenic Escherichia coli EspF effector molecule inhibits PI-3 kinase-mediated uptake independently of mitochondrial targeting*. Cell Microbiol, 2006. **8**(6): p. 972-81.
70. Shaw, R.K., K. Smollett, J. Cleary, J. Garmendia, A. Straatman-Iwanowska, G. Frankel, and S. Knutton, *Enteropathogenic Escherichia coli type III effectors EspG and EspG2 disrupt the microtubule network of intestinal epithelial cells*. Infect Immun, 2005. **73**(7): p. 4385-90.
71. Tomson, F.L., V.K. Viswanathan, K.J. Kanack, R.P. Kanteti, K.V. Straub, M. Menet, J.B. Kaper, and G. Hecht, *Enteropathogenic Escherichia coli EspG disrupts microtubules and in conjunction with Orf3 enhances perturbation of the tight junction barrier*. Mol Microbiol, 2005. **56**(2): p. 447-64.
72. Dean, P., S. Muhlen, S. Quitard, and B. Kenny, *The bacterial effectors EspG and EspG2 induce a destructive calpain activity that is kept in check by the co-delivered Tir effector*. Cell Microbiol.
73. Tu, X., I. Nisan, C. Yona, E. Hanski, and I. Rosenshine, *EspH, a new cytoskeleton-modulating effector of enterohaemorrhagic and enteropathogenic Escherichia coli*. Mol Microbiol, 2003. **47**(3): p. 595-606.
74. Dong, N., L. Liu, and F. Shao, *A bacterial effector targets host DH-PH domain RhoGEFs and antagonizes macrophage phagocytosis*. EMBO J. **29**(8): p. 1363-76.

75. Shames, S.R., W. Deng, J.A. Guttman, C.L. de Hoog, Y. Li, P.R. Hardwidge, H.P. Sham, B.A. Vallance, L.J. Foster, and B.B. Finlay, *The pathogenic E. coli type III effector EspZ interacts with host CD98 and facilitates host cell prosurvival signalling*. Cell Microbiol.
76. Jepson, M.A., S. Pellegrin, L. Peto, D.N. Banbury, A.D. Leard, H. Mellor, and B. Kenny, *Synergistic roles for the Map and Tir effector molecules in mediating uptake of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) into non-phagocytic cells*. Cell Microbiol, 2003. **5**(11): p. 773-83.
77. Mellies, J.L., S.J. Elliott, V. Sperandio, M.S. Donnenberg, and J.B. Kaper, *The Per regulon of enteropathogenic Escherichia coli : identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler)*. Mol Microbiol, 1999. **33**(2): p. 296-306.
78. Giron, J.A., A.S. Ho, and G.K. Schoolnik, *An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic Escherichia coli*. Science, 1991. **254**(5032): p. 710-3.
79. Bieber, D., S.W. Ramer, C.Y. Wu, W.J. Murray, T. Tobe, R. Fernandez, and G.K. Schoolnik, *Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic Escherichia coli*. Science, 1998. **280**(5372): p. 2114-8.
80. Barba, J., V.H. Bustamante, M.A. Flores-Valdez, W. Deng, B.B. Finlay, and J.L. Puente, *A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA*. J Bacteriol, 2005. **187**(23): p. 7918-30.
81. Thanabalasuriar, A., A. Koutsouris, A. Weflen, M. Mimee, G. Hecht, and S. Gruenheid, *The bacterial virulence factor NleA is required for the disruption of intestinal tight junctions by enteropathogenic Escherichia coli*. Cell Microbiol. **12**(1): p. 31-41.
82. Hemrajani, C., C.N. Berger, K.S. Robinson, O. Marches, A. Mousnier, and G. Frankel, *NleH effectors interact with Bax inhibitor-1 to block apoptosis during enteropathogenic Escherichia coli infection*. Proc Natl Acad Sci U S A. **107**(7): p. 3129-34.
83. Echtenkamp, F., W. Deng, M.E. Wickham, A. Vazquez, J.L. Puente, A. Thanabalasuriar, S. Gruenheid, B.B. Finlay, and P.R. Hardwidge, *Characterization of the NleF effector protein from attaching and effacing bacterial pathogens*. FEMS Microbiol Lett, 2008. **281**(1): p. 98-107.
84. Kelly, M., E. Hart, R. Mundy, O. Marches, S. Wiles, L. Badea, S. Luck, M. Tauschek, G. Frankel, R.M. Robins-Browne, and E.L. Hartland, *Essential role of the type III secretion system effector NleB in colonization of mice by Citrobacter rodentium*. Infect Immun, 2006. **74**(4): p. 2328-37.
85. Nadler, C., K. Baruch, S. Kobi, E. Mills, G. Haviv, M. Farago, I. Alkalay, S. Bartfeld, T.F. Meyer, Y. Ben-Neriah, and I. Rosenshine, *The type III secretion effector NleE inhibits NF-kappaB activation*. PLoS Pathog. **6**(1): p. e1000743.
86. Salinger, N., B. Kokona, R. Fairman, and I.N. Okeke, *The plasmid-encoded regulator activates factors conferring lysozyme resistance on enteropathogenic Escherichia coli strains*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(1): p. 275-80.
87. Badea, L., S. Doughty, L. Nicholls, J. Sloan, R.M. Robins-Browne, and E.L. Hartland, *Contribution of Efa1/LifA to the adherence of enteropathogenic Escherichia coli to epithelial cells*. Microb Pathog, 2003. **34**(5): p. 205-15.
88. Klapproth, J.M., I.C. Scaletsky, B.P. McNamara, L.C. Lai, C. Malstrom, S.P. James, and M.S. Donnenberg, *A large toxin from pathogenic Escherichia coli strains that inhibits lymphocyte activation*. Infect Immun, 2000. **68**(4): p. 2148-55.
89. Vidal, J.E. and F. Navarro-Garcia, *EspC translocation into epithelial cells by enteropathogenic Escherichia coli requires a concerted participation of type V and III secretion systems*. Cell Microbiol, 2008. **10**(10): p. 1975-86.
90. Mellies, J.L., F. Navarro-Garcia, I. Okeke, J. Frederickson, J.P. Nataro, and J.B. Kaper, *espC pathogenicity island of enteropathogenic Escherichia coli encodes an enterotoxin*. Infect Immun, 2001. **69**(1): p. 315-24.
91. Dommett, R., M. Zilbauer, J.T. George, and M. Bajaj-Elliott, *Innate immune defence in the human gastrointestinal tract*. Mol Immunol, 2005. **42**(8): p. 903-12.
92. Abreu, M.T., *Toll-like receptor signalling in the intestinal epithelium: how bacterial recognition shapes intestinal function*. Nat Rev Immunol, 2010. **10**(2): p. 131-44.
93. Hansen, M.B. and A.B. Witte, *The role of serotonin in intestinal luminal sensing and secretion*. Acta Physiol (Oxf), 2008. **193**(4): p. 311-23.

94. Kim, Y.S. and S.B. Ho, *Intestinal goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress*. Curr Gastroenterol Rep, 2010. **12**(5): p. 319-30.
95. Ouellette, A.J., *Paneth cell alpha-defensins in enteric innate immunity*. Cell Mol Life Sci, 2011.
96. Novak, N. and T. Bieber, *2. Dendritic cells as regulators of immunity and tolerance*. J Allergy Clin Immunol, 2008. **121**(2 Suppl): p. S370-4; quiz S413.
97. Kyd, J.M. and A.W. Cripps, *Functional differences between M cells and enterocytes in sampling luminal antigens*. Vaccine, 2008. **26**(49): p. 6221-4.
98. Wullaert, A., *Role of NF-kappaB activation in intestinal immune homeostasis*. Int J Med Microbiol, 2010. **300**(1): p. 49-56.
99. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Signaling to NF-kappaB*. Genes Dev, 2004. **18**(18): p. 2195-224.
100. Chen, L.F. and W.C. Greene, *Shaping the nuclear action of NF-kappaB*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(5): p. 392-401.
101. Kagnoff, M.F. and L. Eckmann, *Epithelial cells as sensors for microbial infection*. J Clin Invest, 1997. **100**(1): p. 6-10.
102. Jutras, I. and M. Desjardins, *Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2005. **21**: p. 511-27.
103. Stuart, L.M. and R.A. Ezekowitz, *Phagocytosis: elegant complexity*. Immunity, 2005. **22**(5): p. 539-50.
104. May, R.C. and L.M. Machesky, *Phagocytosis and the actin cytoskeleton*. J Cell Sci, 2001. **114**(Pt 6): p. 1061-77.
105. Aderem, A. and D.M. Underhill, *Mechanisms of phagocytosis in macrophages*. Annu Rev Immunol, 1999. **17**: p. 593-623.
106. Stuart, L.M. and R.A. Ezekowitz, *Phagocytosis and comparative innate immunity: learning on the fly*. Nat Rev Immunol, 2008. **8**(2): p. 131-41.
107. Lindmo, K. and H. Stenmark, *Regulation of membrane traffic by phosphoinositide 3-kinases*. J Cell Sci, 2006. **119**(Pt 4): p. 605-14.
108. Marches, O., V. Covarelli, S. Dahan, C. Cougoule, P. Bhatta, G. Frankel, and E. Caron, *EspJ of enteropathogenic and enterohaemorrhagic Escherichia coli inhibits opsono-phagocytosis*. Cell Microbiol, 2008. **10**(5): p. 1104-15.
109. Paris, L., L. Tonutti, C. Vannini, and G. Bazzoni, *Structural organization of the tight junctions*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 646-59.
110. Niessen, C.M., *Tight junctions/adherens junctions: basic structure and function*. J Invest Dermatol, 2007. **127**(11): p. 2525-32.
111. Dean, P., S. Muhlen, S. Quitard, and B. Kenny, *The bacterial effectors EspG and EspG2 induce a destructive calpain activity that is kept in check by the co-delivered Tir effector*. Cell Microbiol. **12**(9): p. 1308-21.
112. Yuhan, R., A. Koutsouris, S.D. Savkovic, and G. Hecht, *Enteropathogenic Escherichia coli-induced myosin light chain phosphorylation alters intestinal epithelial permeability*. Gastroenterology, 1997. **113**(6): p. 1873-82.
113. Simonovic, I., J. Rosenberg, A. Koutsouris, and G. Hecht, *Enteropathogenic Escherichia coli dephosphorylates and dissociates occludin from intestinal epithelial tight junctions*. Cell Microbiol, 2000. **2**(4): p. 305-15.
114. Murek, M., S. Kopic, and J. Geibel, *Evidence for intestinal chloride secretion*. Exp Physiol. **95**(4): p. 471-8.
115. Hodges, K., N.M. Alto, K. Ramaswamy, P.K. Dudeja, and G. Hecht, *The enteropathogenic Escherichia coli effector protein EspF decreases sodium hydrogen exchanger 3 activity*. Cell Microbiol, 2008. **10**(8): p. 1735-45.
116. Gill, R.K., A. Borthakur, K. Hodges, J.R. Turner, D.R. Clayburgh, S. Saksena, A. Zaheer, K. Ramaswamy, G. Hecht, and P.K. Dudeja, *Mechanism underlying inhibition of intestinal apical Cl/OH exchange following infection with enteropathogenic E. coli*. J Clin Invest, 2007. **117**(2): p. 428-37.
117. Hayden, M.S. and S. Ghosh, *Shared principles in NF-kappaB signaling*. Cell, 2008. **132**(3): p. 344-62.
