

CARACTERISATION DE L'OPERON *fim* D'UNE SOUCHE D'E. COLI PATHOGENE POUR LA VOLAILLE

Marc D. et Dho-Moulin, M.

Station de Pathologie Aviaire et de Parasitologie
INRA - Centre de Tours 37380 Nouzilly

Résumé : Parmi les facteurs de virulence des *Escherichia coli* pathogènes pour les volailles, l'expression de fimbriae semble être l'élément clé de la phase initiale de l'infection, en permettant aux bactéries d'adhérer aux muqueuses de l'appareil respiratoire et d'envahir ce dernier. A partir d'une souche aviaire très virulente, nous avons cloné puis séquencé l'opéron *fim* responsable de la synthèse des fimbriae de type 1. La comparaison de notre séquence avec d'autres séquences déjà publiées révèle la présence de sites hypervariables au sein de la protéine majoritaire des fimbriae (FimA). Ces sites correspondent probablement à des motifs antigéniques de la protéine. En outre, nous avons caractérisé le gène *fimI*, qui code pour une sous-unité fimbriale mineure dont on ignore encore le rôle. Nos prochains travaux consisteront à introduire des mutations dans les gènes *fim* de notre souche virulente afin de préciser le rôle des fimbriae dans la pathogénicité.

Characterization of the *fim* operon from an avian pathogenic strain of *Escherichia coli*

Abstract : The expression of fimbriae seems to be one of the virulence factors allowing avian pathogenic strains of *Escherichia coli* to adhere to mucosa and invade the respiratory tract of infected chickens. We have cloned and sequenced the *fim* operon, coding for the synthesis of fimbriae, from an avian strain of *E. coli*. Comparisons of MT78 *fimA* sequence with other known *fimA* sequences revealed the presence of variable sites within the major fimbrial protein. These sites probably correspond to antigenic motifs exposed at the surface of the protein. Furthermore, we have characterized the *fimI* gene, which putatively encodes another minor fimbrial subunit of unknown function. We are now planning deletions experiments within the *fim* operon, in order to precise the involvement of fimbriae in the successive steps of the infection.

Introduction

La colibacillose aviaire est une pathologie dominante dans les problèmes respiratoires des volailles en élevage industriel. Due le plus souvent à des souches de sérotype O1, O2 et O78 en France, cette affection à point de départ respiratoire est secondaire à une infection virale ou mycoplasmaïque. Elle se traduit cliniquement par des lésions fibrineuses des séreuses (péricardite, périhépatite) et conduit à une septicémie entraînant la mort de l'animal. Des travaux, réalisés dans notre laboratoire et par d'autres équipes, ont montré l'existence d'un certain nombre de facteurs de virulence chez les souches d'*E. coli* aviaires les plus pathogènes. Ces facteurs de virulence sont: i) la capacité à croître dans un milieu pauvre en fer, grâce au système aérobactine de captation du fer, ii) l'expression de fimbriae qui permettent aux bactéries d'adhérer au mucus et aux cellules de l'épithélium respiratoire, iii) la résistance au pouvoir bactéricide du sérum, qui semble liée à la présence de l'antigène capsulaire K1. La production de cytotoxines, peu étudiée jusqu'à présent sur les souches aviaires, pourrait également constituer un facteur de virulence.

La plupart des souches d'*E. coli* portent à leur surface des fimbriae de type 1. Ces derniers, ancrés dans la membrane externe de la bactérie, sont constitués de la polymérisation d'une protéine majoritaire, FimA, et portent à leur extrémité des protéines minoritaires, dont une adhésine, FimH, qui permet aux bactéries d'adhérer au mucus et à la surface des cellules épithéliales. L'expression de fimbriae dans l'appareil respiratoire, observée *in vivo* chez des poulets infectés expérimentalement, semble accréditer le rôle des fimbriae dans les premières étapes de l'infection (Dozois *et al.*, 1994).

Nous nous sommes fixé comme premier objectif de vérifier *in vivo* l'importance des fimbriae et d'étudier leurs fonctions aux différents stades de l'infection. En effet, notre système expérimental nous permet d'analyser les propriétés des différentes souches d'*E. coli* chez leur hôte naturel, le poulet. Dans cet objectif, nous avons cloné l'opéron *fim* d'une souche pathogène aviaire pour y introduire des mutations qui seront remplacées par échange allélique dans la souche d'origine. Nous avons choisi pour cela la souche MT78, une souche O2:K1 très pathogène isolée d'un élevage avicole. Cette souche a été jusqu'à présent la mieux étudiée dans le laboratoire, et sa virulence élevée a fait d'elle le témoin positif de toutes les expérimentations réalisées sur les volailles. En outre, des travaux précédents dans notre laboratoire avaient permis de montrer que les souches de sérotype O2, auquel appartient MT78, produisent des fimbriae de type 1 dont les propriétés (poids moléculaire et séquence N-terminale de la sous-unité majoritaire) les distinguent nettement des fimbriae type 1 de référence (Dho-Moulin *et al.*, 1990).

A) Caractérisation de l'opéron *fim* de MT78

Après constitution d'une banque génomique de MT78, l'opéron *fim* a été cloné et séquencé. L'opéron *fim* fait environ 10.5 kb et comporte 9 gènes (voir figure 1). j'en ai séquencé 8.5 kb, en deux portions de 5.2 et 3.3 kb de part et d'autre du gène *fimD*. La première partie comporte les gènes *fimB*, *fimE*, *fimA*, *fimI* et *fimC*. La seconde partie contient *fimF*, *fimG*, *fimH* et environ 1 kb au-delà de *fimH*.

Figure 1: Organisation de l'opéron *fim*. Les produits de *fimB* et *fimE*, en modifiant l'orientation de l'élément invertible (losange en amont de *fimA*), régulent l'expression des gènes de structure situés en aval. *fimA* code pour la protéine majeure, dont l'empilement forme l'essentiel de la structure fimbriale. FimC et FimD sont impliquées dans le transport des sous-unités et l'ancrage membranaire du fimbriae. FimF et FimG sont localisées à l'extrémité du fimbriae: elles joueraient un rôle dans la terminaison du fimbriae et assureraient la liaison entre la structure fimbriale et l'adhésine codée par *fimH*. On ignore encore le rôle de la protéine FimI, qui cependant présente des homologies avec les autres protéines FimA. FimF et FimG.



- Conservation des gènes *fimB*, *fimE* et *fimC*.

Les séquences des gènes *fimB* et *fimE* sont très proches de celles déjà publiées pour une souche K12. Il en est de même de l'élément invertible contenant le promoteur. Le gène *fimC*, dont le produit est impliqué dans l'assemblage des fimbriae, est également très conservé.

- Variabilité du gène *fimA*.

La séquence du gène *fimA*, codant pour la sous-unité majoritaire des fimbriae, a été comparée aux séquences homologues les plus proches. Cinq séquences sont très similaires à la notre: trois sont issues d'*Escherichia coli* (une souche K12, une souche isolée chez l'homme et une souche aviaire O78), les deux autres proviennent de deux souches humaines de *Klebsiella pneumoniae*. Comme cela avait été observé pour la séquence de *fimA* de la souche aviaire O78 (Sekizaki *et al.*, 1993), notre séquence se révèle plus proche de celle de *K. pneumoniae* que de celles issues d'une souche d'*E. coli* K12 ou d'une souche humaine. En outre, une comparaison multiple incluant tous les variants de *fimA* dont les séquences sont disponibles dans les banques de données révèle que la plupart des différences entre ces séquences sont concentrées dans quatre régions du gène *fimA*. Ces quatre régions correspondent, dans la protéine FimA, aux acides aminés 24 à 27 (extrémité N-terminale de la protéine mature), 66 à 70, 105 à 109 et 134 à 137. Ces sites "hypervariables" coïncident avec des régions hydrophiles de la protéine associées à un index antigénique significatif. Il est donc probable qu'ils correspondent à des sites antigéniques dont la variabilité pourrait rendre compte des propriétés antigéniques distinctes des variants de FimA.

- Identification du gène *fimI*

Le travail de séquençage a permis d'identifier et de caractériser le gène *fimI*, localisé en aval de *fimA*, et dont aucune séquence n'a encore été publiée pour *E. coli*. La protéine FimI présente des homologies avec la plupart des sous-unités fimbrillaires, et constitue probablement une sous-unité minoritaire des fimbriae. Elle présente une homologie de ~60% avec la protéine FimI de *Salmonella typhi*, dont le gène a récemment été séquencé. Cependant, seules des données expérimentales permettront d'assigner à cette protéine une fonction dans l'organisation structurale et la biogenèse des fimbriae.

- gènes *fimF*, *fimG* et *fimH*.

La séquence des gènes *fimF*, *fimG* et *fimH* a également été déterminée, puis comparée aux séquences déjà publiées. Le gène *fimH* est très conservé, puisque sur les 302 acides aminés de la protéine, seulement 6 substitutions sont observées entre FimH de MT78 et la protéine FimH des fimbriae type 1 de référence. La comparaison des gènes *fimF* et *fimG* de MT78 avec les séquences déjà publiées fait apparaître des différences plus nombreuses, mais rien ne permet de dire si les différences observées relativement aux FIA de référence sont propres au sérotype O2 (auquel appartient MT78) ou bien représentent des particularités des souches aviaires en général.

B) Modifications de l'opéron *fim*.

Le clonage et le séquençage de l'opéron *fim* ne constituent que les premières étapes devant conduire à la construction de mutants *fim* de MT78. Plusieurs mutations sont en cours de construction dans l'opéron *fim*. La première mutation réalisée a consisté à déléter la totalité de l'opéron, sans toucher aux régions adjacentes. Le fragment portant la délétion sera cloné dans un vecteur suicide (pCVD442) qui sera transféré par conjugaison dans la souche MT78. Ce système devrait permettre de substituer exactement un gène cible par sa version mutée ou délétée (échange allélique).

Si ce système fonctionne correctement, nous l'appliquerons à des modifications plus précises de l'opéron *fim* dans la souche MT78. En particulier, nous réaliserons la délétion du seul gène *fimH*, codant pour l'adhésine, afin de déterminer son rôle dans la pathogénicité. D'autre part, il sera intéressant de déterminer le rôle de la protéine FimI, dont j'ai réalisé la séquence. FimI est en effet la seule sous-unité fimbrillaire dont on ignore la fonction. En utilisant la même approche, nous construirons un mutant *fimI*⁻ dont nous analyserons les propriétés quant à la synthèse des fimbriae.

C) Perspectives

Tous les mutants décrits dans le paragraphe précédent seront testés dans le modèle animal, afin d'analyser leurs propriétés pathogènes et de mieux comprendre le rôle des fimbriae aux différentes étapes de l'infection.

Enfin, la construction de mutants isogéniques pourra ensuite être appliquée à d'autres facteurs de virulence dont les gènes seront extraits de la banque génomique réalisée pour MT78, afin de construire des mutants exprimant diverses associations des facteurs de virulence identifiés.

REFERENCES

- 1-Dozois, C.M., Chanteloup, N., Dho-Moulin, M., Brée, A., Desautels, C. and Fairbrother, J.M., 1994. Avian Dis. **38**, 231-239.
- 2-Sekizaki, T., Ito, H., Asawa, T., and Nonomura, I., 1993. J. Vet. Med. Sci. **3**, 395-400.
- 3-Dho-Moulin, M., van den Bosch, J.F., Girardeau, J.P., Brée, A. and Lafont, J.P., 1990. Infect. Immun. **58**, 740-745.