

Université du Québec
Institut National de la Recherche Scientifique
Institut Armand-Frappier

Régulation de l'hémolysine α de la souche uropathogène d'*Escherichia coli* CFT073 par Fur et RyhB

Par
Krysten Le Luel

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de
maître ès sciences (M. Sc.) en microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jonathan Perreault
Institut Armand Frappier
INRS

Examineur externe

Sébastien Faucher
Natural resource sciences
McGill University

Directeur de recherche

Charles M. Dozois
Institut Armand Frappier
INRS

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, j'aimerais remercier Charles pour la confiance que tu m'as accordée en me confiant ce projet, et surtout pour toutes les connaissances scientifiques que j'ai pu acquérir durant ma maîtrise.

Ce projet n'aurait jamais été mené à bien sans l'aide de Sébastien. Je te remercie pour le temps que tu as passé à m'apprendre ou me montrer toutes les techniques présentes dans ce mémoire, et aussi pour les très nombreux fous-rires dans le laboratoire. Clairement, c'est pas faux.

Aussi, je voudrais remercier les autres étudiants du laboratoire, pour votre aide, vos conseils et les discussions autour de cafés et gâteaux. Au moins je suis prête pour l'hiver !

Ensuite, je veux remercier les amis rencontrés à Montréal, c'est grâce à vous que je n'ai pas passé tout mon temps à travailler, mais aussi à découvrir la vie montréalaise. Je n'oublie pas les amis restés en France, je vous remercie d'avoir pris des nouvelles et de votre soutien quand les journées étaient longues.

Enfin, je voudrais remercier mes parents, mes frères et ma petite sœur, pour votre soutien inconditionnel même si partir étudier seule à Montréal était un peu de la folie. Mais aussi parce que vous croyez en moi bien plus que je ne le fais moi-même.

RESUME

Les infections du tractus urinaire sont une des infections bactériennes la plus répandue dans les pays industrialisés, occasionnant de fortes dépenses dans le domaine médical et un fort impact socioéconomique. L'agent causatif le plus commun est *Escherichia coli* uropathogène, ou UPEC. Il existe de nombreux traitements antimicrobiens efficaces, mais les épisodes d'infections récurrentes ne sont pas rares, et des problèmes de résistance à ces traitements commencent à apparaître.

Facteur de virulence très étudié, l'hémolysine α est une cytolysine très commune chez les UPEC. Elle est impliquée dans la formation de pores dans les cellules de l'hôte et induit leur lyse pour faciliter l'acquisition de fer et d'autres nutriments pour la bactérie. C'est pourquoi le but de cette étude était de mettre en évidence un mécanisme de régulation impliquant l'homéostasie du fer à travers Fur et RyhB, ceux-ci étant connus comme étant les régulateurs principaux dans de nombreuses bactéries.

Pour démontrer le lien entre Fur, RyhB et l'hémolysine, des fusions aux gènes rapporteurs *lacZ* et *luxCDABE* ont été utilisés dans la souche CFT073, servant de modèle pour les infections du tractus urinaire dans le laboratoire. L'absence d'augmentation de la production d'hémolysine en conditions pauvres en fer chez les mutants $\Delta ryhB::cat$ indique une stabilisation du transcrit de l'hémolysine par RyhB, un mécanisme peu commun et décrit pour un seul autre gène.

Mots-clés : Hémolysine, *Escherichia coli*, Infection du tractus urinaire, Homéostasie du fer, Fur, RyhB

ABSTRACT

Urinary tract infections, UTIs, are among the most common bacterial infectious disease encountered in the industrialized countries and have profound medical and socioeconomic impact. Uropathogenic *Escherichia coli*, UPEC, is the most common causative agent, which accounts for up to 85% UTIs. In addition, common problem in UTI is a recurrence despite antimicrobial treatment as well as the emergence of drug resistance.

Hemolysin is the most studied toxin and one of the most important cytolytic of UPEC. It is implicated in pore formation in the host cells and promotes their lysis to facilitate iron and nutrient acquisition for the bacteria. Hence, the purpose of this study was to correlate a regulation mechanism involving iron homeostasis through Fur and RyhB, which are the major regulators in numerous bacteria.

To demonstrate the connection between Fur, RyhB and hemolysin, *lacZ* and *luxCDABE* reporter genes have been used in a widely studied UPEC strain, CFT073. The lack of increase in hemolysin's production in iron-poor conditions suggested the stabilization of hemolysin transcript by RyhB by a mechanism only describe once for another gene.

Key-words : Hemolysin, *Escherichia coli*, Urinary tract infection, Iron homeostasis, Fur, RyhB

TABLE DES MATIERES

Remerciements	ii
Résumé	iv
Abstract	vi
Table des matières	viii
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xiv
Liste des abréviations et unités	xvi
Revue de littérature	1
1. Infection du tractus urinaire	1
1.1. Le tractus urinaire.....	2
1.2. Agents causatifs et voies d'infection	3
1.3. Syndromes	4
1.4. Défenses innées de l'hôte	5
1.5. Récurrence	6
2. <i>Escherichia coli</i>	7
2.1. Classification	8
2.2. Pathogénicité.....	11
3. Hémolysine d' <i>Escherichia coli</i>	19
3.1. Toxines RTX.....	19
3.2. Génétique	21
3.3. Régulation	23
3.4. Sécrétion dans le milieu extracellulaire	24
3.5. Rôles	27
4. Homéostasie du fer	32
4.1. Acquisition du fer par les bactéries pathogènes.....	33
4.2. Régulation par Fur.....	37

4.3. Régulation par RyhB	39
4.4. Fonctionnement commun	41
Problématique	43
Matériel et méthodes	47
1. Souches bactériennes	47
2. Conditions de culture	49
3. Réactions de polymérase en chaine	50
4. Phénotype hémolytique	52
5. Activité enzymatique de la β galactosidase	53
6. Activité de luminescence	56
7. Statistiques	61
Résultats	62
1. Vérification du phénotype hémolytique	62
2. Détermination de la production d'hémolysine	63
2.1. Activité enzymatique de la β galactosidase	63
2.2. Activité luminecente	66
Discussion	80
Conclusion	88
Bibliographie	90
Annexes	102

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Organisation cellulaire de l'urothélium.....	2
Figure 2. Pathogénèse de l'infection du tractus urinaire par <i>Escherichia coli</i> uropathogène ..	4
Figure 3. Formation de communautés bactériennes intracellulaires	7
Figure 4. Arbre qualitatif représentant les différents groupes phylogénétiques	10
Figure 5. Modes d'action des <i>Escherichia coli</i> diarrhéiques.....	13
Figure 6. Principaux facteurs de virulence associés aux ExPEC	15
Figure 7. Opéron <i>hly</i> codant pour l'hémolysine	21
Figure 8. Structure et fonction des différents domaines de l'hémolysine.	22
Figure 9. Organisation et fonctionnement du système de sécrétion de type 1.....	26
Figure 10. Séquences consensus pour le régulateur Fur : "Fur Box".....	37
Figure 11. Mécanisme de répression par Fur.....	38
Figure 12. Structure secondaire de RyhB	39
Figure 13. Régulation de Fur et RyhB	41
Figure 14. Fonctionnement de la technique MAPS	45
Figure 15. Organisation de l'opéron <i>lac</i> dans les plasmides de fusion.....	53
Figure 16. Régions de l'opéron <i>hlyCABD</i> utilisées dans les fusions lactose.....	54
Figure 17. Organisation et carte de restriction de l'opéron <i>lux</i>	56
Figure 18. Régions de l'opéron <i>hlyCABD</i> utilisées dans les fusions luciférase.....	57
Figure 19. Organisation de l'opéron <i>ara</i>	59
Figure 20. Croissance et hémolyse de spots de 10 µL de bouillon de CFT073	62
Figure 21. Distance d'hémolyse pour des colonies isolées de CFT073.....	63
Figure 22. Transcription de l'hémolysine – fusion transcriptionnelle <i>Phly::lac</i>	64
Figure 23. Transcription de l'hémolysine – fusion transcriptionnelle <i>PhlyCA::lac</i>	64
Figure 24. Traduction de l'hémolysine – fusion traductionnelle <i>PhlyC::lac</i>	65
Figure 25. Traduction de l'hémolysine – fusion traductionnelle <i>PhlyCA::lac</i>	65

Figure 26. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer lors d'une cinétique de 24 heures	67
Figure 27. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 lors d'une cinétique de 24 heures	67
Figure 28. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 100 μM de dipyridyl lors d'une cinétique de 24 heures	68
Figure 29. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer lors d'une cinétique de 24 heures	69
Figure 30. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 lors d'une cinétique de 24 heures	69
Figure 31. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 100 μM de dipyridyl lors d'une cinétique de 24 heures	70
Figure 32. Transcription de l'hémolysine en milieu pauvre en fer lors d'une cinétique de 24 heures	71
Figure 33. Transcription de l'hémolysine en milieu pauvre en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 lors d'une cinétique de 24 heures	72
Figure 34. Transcription de l'hémolysine en milieu pauvre en fer chélaté par 100 μM de dipyridyl lors d'une cinétique de 24 heures	72
Figure 35. Traduction de l'hémolysine en milieu pauvre en fer lors d'une cinétique de 24 heures	73
Figure 36. Traduction de l'hémolysine en milieu pauvre en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 lors d'une cinétique de 24 heures	74
Figure 37. Traduction de l'hémolysine en milieu pauvre en fer chélaté par 100 μM de dipyridyl lors d'une cinétique de 24 heures	74
Figure 38. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μM de dipyridyl où l'expression de <i>ryhB</i> est induite par 0,1 % d'arabinose	75
Figure 39. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 où l'expression de <i>ryhB</i> est induite par 0,1 % d'arabinose.....	76
Figure 40. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μM de dipyridyl où l'expression de <i>ryhB</i> est réprimée par 0,2 % de glucose	76
Figure 41. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 où l'expression de <i>ryhB</i> est réprimée par 0,2 % de glucose	77

Figure 42. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μM de dipyridyl où l'expression de <i>ryhB</i> est induite par 0,1 % d'arabinose	78
Figure 43. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 où l'expression de <i>ryhB</i> est induite par 0,1 % d'arabinose	78
Figure 44. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μM de dipyridyl où l'expression de <i>ryhB</i> est réprimée par 0,2 % de glucose	79
Figure 45. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 où l'expression de <i>ryhB</i> est réprimée par 0,2 % de glucose	79
Figure 46. Résumé des cinétiques de transcription de l'hémolysine	83
Figure 47. Résumé des cinétiques de traduction de l'hémolysine	84
Figure 48. Résumé des cinétiques de transcription de l'hémolysine selon l'induction de <i>ryhB</i>	85
Figure 49. Résumé des cinétiques de traduction de l'hémolysine selon l'induction de <i>ryhB</i>	86
Figure S1. pIJ526	102
Figure S2. pIJ527	103
Figure S3. pIJ528	104
Figure S4. pIJ529	105
Figure S5. pIJ536	106
Figure S6. pIJ537	107
Figure S7. pSTNSK	108
Figure S8. Croissance de CFT073 en LB	109
Figure S9. Croissance de CFT073 en LB 10 μM FeCl_3	109
Figure S10. Croissance de CFT073 en LB 100 μM dipyridyl	110
Figure S11. Croissance de CFT073 en M63 glycérol	110
Figure S12. Croissance de CFT073 en M63 glycérol 10 μM FeCl_3	111
Figure S13. Croissance de CFT073 en M63 glycérol 100 μM dipyridyl	111
Figure S14. Croissance de CFT073 et des mutants $\Delta\text{fur}::\text{FRT}$, $\Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ et $\Delta\text{fur}::\text{FRT}$ $\Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ en LB	112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Facteurs de virulence associés aux UPEC.....	16
Tableau 2. Souches utilisées lors de l'étude.....	47
Tableau 3. Plasmides utilisés lors de l'étude.....	49
Tableau 4. Amorces utilisées lors de l'étude	51

LISTE DES ABREVIATIONS ET UNITES

°C	Degrés Celsius	
ABC	(eng.) ATP Binding Cassette	Cassette de liaison à l'ATP
ABU	(eng.) Asymptomatic Bacteriuria	Bactériurie asymptomatique
ACP	(eng.) Acyl Carrier Protein	Protéine porteuse d'acyle
ADN	Acide Désoxyribonucléique	
Amp ^R	Résistant à l'ampicilline	
ARN	Acide Ribonucléique	
ARNm	ARN messenger	
ARNt	ARN de transfert	
ATP	Adénosine Triphosphate	
AUM	(eng.) Asymmetric Unit Membrane	Membrane asymétrique
CFU	(eng.) Colony Forming Unit	Unité formant des colonies
Cm ^R	Résistant au chloramphénicol	
CNF1	(eng.) Cytotoxic Necrotizing Factor 1	Facteur cytotoxique nécrosant
DAEC	(eng.) Diffusely adherent <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> à adhérence diffuse
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	
EAEC	(eng.) Enteroaggregative <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> entéroaggrégative
EHEC	(eng.) Enterohemorrhagic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> entérohémorragique
EIEC	(eng.) Enteroinvasive <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> entéroinvasive
EPEC	(eng.) Enteropathogenic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> entéropathogène
ETEC	(eng.) Enterotoxigenic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> entérotoxigénique
ExPEC	(eng.) Extraintestinal Pathogenic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> pathogène extraintestinal
Gm ^R	Résistant à la gentamicine	
GTP	Guanosine Triphosphate	
IBC	(eng.) Intracellular Bacterial Community	Communauté bactérienne intracellulaire
IL	Interleukine	

InPEC	Intestinal Pathogenic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> pathogène intestinal
kDa	kilodalton	
Km ^R	Résistant à la kanamycine	
LPS	Lipopolysaccharide	
M	Molaire	
MAPS	(eng.) MS2 Affinity Purification	Purification par affinité au MS2
MCS	(eng.) Multiple Cloning Site	Site de clonage multiple
mg	milligrammes	
mL	millilitres	
MLEE	(eng.) Multilocus Enzyme Electrophoresis	Electrophorèse d'enzymes multilocus
MLST	(eng.) Multilocus Sequence Typing	Typage de séquences multilocus
mM	millimolaire	
mV	millivolt	
nm	nanomètre	
NMEC	(eng.) Neonatal Meningitis <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> causant la méningite néonatale
PAI	(eng.) Pathogenicity Island	Ilot de pathogénicité
PCR	(eng.) Polymerase Chain Reaction	Réaction de polymérase en chaîne
rpm	(eng.) rotation per minute	Tours par minute
RTX	(eng.) Repeat in Toxin	<i>Pas d'équivalent français</i>
SPATES	(eng.) Serine Protease Autotransporters of <i>Enterobacteriaceae</i>	Autotransporteur sérine protéase des <i>Enterobacteriaceae</i>
spp.	(lat.) species pluralis	Espèces
sRNA	(eng.) small RNA	Petit ARN non codant
UP	(eng.) Uroplakin	Uroplaquine
UPEC	(eng.) Uropathogenic <i>E. coli</i>	<i>E. coli</i> uropathogène
UTI	(eng.) Urinary Tract Infection	Infection du tractus urinaire
UTR	(eng.) Untranslated Region	Région non traduite

v/v volume / volume

μL microlitre

REVUE DE LITTÉRATURE

1. Infection du tractus urinaire

Le tractus urinaire est l'un des sites d'infection bactérienne le plus commun chez l'homme et *Escherichia coli* est l'agent infectieux majoritaire (Hagan *et al.*, 2009, Kaper *et al.*, 2004, Stenutz *et al.*, 2006). C'est pourquoi les infections du tractus urinaire, ou UTI, sont considérées comme l'une des infections bactériennes les plus fréquentes chez l'homme (Foxman, 2002, Mulvey, 2002). Elle est due à la présence d'un nombre significatif d'organismes pathogènes dans le tractus urinaire, ce qui transparait dans les urines. En effet, on considère qu'il y a infection du tractus urinaire lorsqu'au moins 100 bactéries uropathogènes sont présentes par mL d'urine (Hagan *et al.*, 2009). Aux Etats-Unis, avec environ 7 millions de personnes atteintes chaque année, il est estimé qu'environ une femme sur trois souffrira d'une UTI avant ses 65 ans (Hagan *et al.*, 2009, Mulvey *et al.*, 2000). Cependant, l'incidence réelle de cette infection est difficile à déterminer, car cette infection facile à traiter est rarement rapportée par les médecins (Foxman, 2002).

Même si toute la population peut développer une UTI, les femmes y sont plus susceptibles, notamment parce que leur urètre est plus court que celui des hommes (Bower *et al.*, 2005, Hagan *et al.*, 2009, Hooton *et al.*, 1997, Marrs *et al.*, 2005, Mulvey, 2002, Mulvey *et al.*, 2000, Sussman, 1997). De plus, chez l'homme, la distance entre l'anus, source supposée des uropathogènes, et le méat urétral est plus grande, l'environnement sec de cette région est également moins favorable aux bactéries et enfin, le fluide prostatique possède une activité antimicrobienne (Hooton *et al.*, 1997). Aussi, les patients ayant un tractus urinaire anormal, obstrué ou les patients immunodéprimés ont un plus gros risque de souffrir d'infection du tractus urinaire, mais aussi qu'une simple UTI devienne une infection systémique (Wiles *et al.*, 2008b).

1.1. Le tractus urinaire

Le tractus urinaire humain est protégé des pathogènes éventuels par un flux d'urine empêchant l'adhésion d'organismes étrangers, mais aussi par des facteurs antibactériens qui peuvent aussi bien être sécrétés qu'associés au tissu épithélial de la vessie et enfin par les activités bactéricides de certaines cellules immunitaires (Bower *et al.*, 2005, Mulvey *et al.*, 2000). De plus, le tractus urinaire est un environnement plutôt hostile. En effet, celui-ci est plutôt acide, ce qui inhibe la croissance bactérienne, l'urine contient également des sels, de l'urée et des acides organiques qui réduisent les chances de survie des bactéries. Enfin, l'adhésion continue de bactéries sur l'épithélium du tractus urinaire, ou urothélium, a pour effet d'activer les mécanismes de défense de l'hôte (Mulvey *et al.*, 2000).

La surface lumenale de la vessie est recouverte d'un épithélium de transition, appelé urothélium, qui consiste en trois ou quatre couches de cellules, celui-ci est représenté dans la figure 1 ci-dessous. Son rôle principal est de former une barrière physique entre l'urine et le sang (Hicks, 1975, Lewis, 2000). Les cellules qui le composent varient énormément, à sa base on trouve de petites cellules pas ou peu différenciées et plus on se rapproche de la surface, plus les cellules sont importantes, différenciées et binucléées. Les cellules à la surface de l'épithélium sont appelées cellules parapluies. En temps normal, le taux de renouvellement et de maturation des cellules de l'urothélium est très lent, mais s'il est endommagé on peut constater une forte prolifération cellulaire afin de remplacer les cellules endommagées ou mortes (Hicks, 1975).

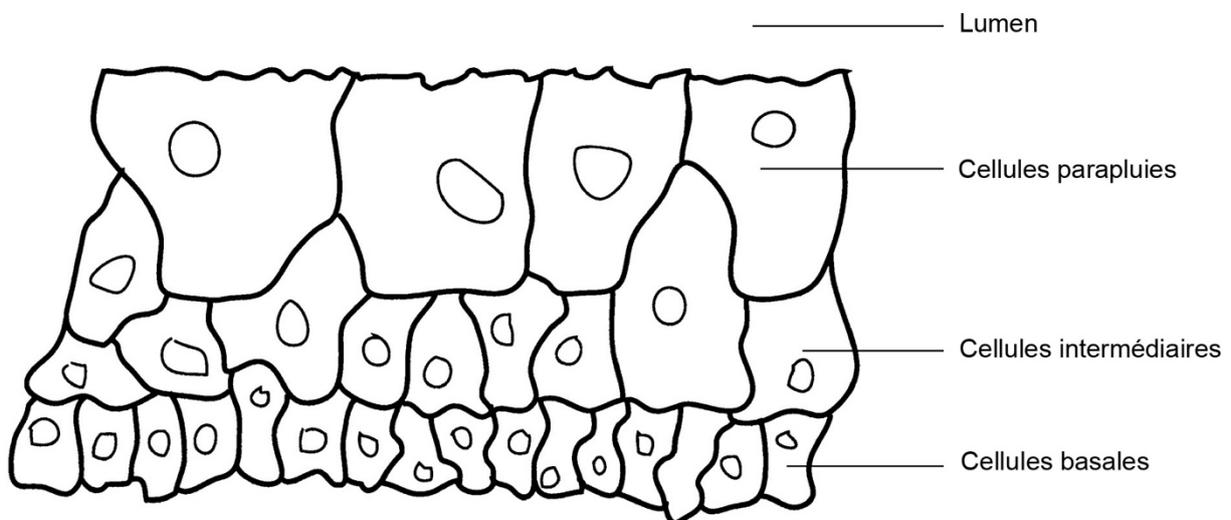


Figure 1. Organisation cellulaire de l'urothélium. L'épithélium du tractus urinaire est composé d'une couche de cellules basales peu différenciées, puis d'une couche de cellules intermédiaires et enfin d'une couche de cellules parapluies, généralement de grande taille, multinucléées et différenciées. Adapté de Lewis (2000).

Sur la surface apicale des cellules parapluies on trouve des complexes hexagonaux formés de quatre glycoprotéines membranaires, les uroplaquines (Hagan *et al.*, 2009). Ces protéines appelées UPIa, UPIb, UPII et UPIII, pesant respectivement 27 kDa, 28 kDa, 15 kDa et 47 kDa, sont très conservées parmi les mammifères (Lewis, 2000, Mulvey *et al.*, 2000). Les uroplaquines interagissent spécifiquement entre elles, en effet UPIa ne forme des complexes qu'avec UPII et UPIb uniquement avec UPIII (Wu *et al.*, 1995). Elles s'assemblent en complexes hexagonaux de 16 nm de diamètre formés d'un anneau intérieur de six UPIa ou de six UPIb et d'un anneau extérieur de six UPII ou de six UPIII (Lewis, 2000). Ces complexes s'organisent ensuite en plaques de 0,3 à 0,5 µm de diamètre qui recouvrent entre 70 % et 90 % de la surface lumenale de la vessie (Lewis, 2000, Mulvey, 2002). Cette membrane d'uroplaquines est appelée AUM, pour Asymmetric Unit Membrane, en effet elle rend le feuillet externe de la membrane apicale des cellules parapluie plus épais que le feuillet interne (Lewis, 2000, Mulvey *et al.*, 2000). Ceci permet de fortifier les cellules superficielles afin de prévenir la rupture de la vessie quand celle-ci grossit pour recevoir plus d'urine (Mulvey, 2002, Mulvey *et al.*, 2000).

1.2. Agents causatifs et voies d'infection

Plusieurs bactéries sont responsables d'infections du tractus urinaire. La plus répandue est *Escherichia coli*, qui cause environ 80% des cas d'UTI acquis en communauté et 50% des cas nosocomiaux (Cooke *et al.*, 1975, Hagan *et al.*, 2009, Hooton *et al.*, 1997, Mulvey, 2002, Wiles *et al.*, 2008b). Ensuite, 10 à 15 % des cas sont causés par *Staphylococcus saprophyticus*, et de façon très sporadique, *Klebsiella* spp. ou *Enterococcus faecalis* peuvent être également isolés depuis des patients atteints d'infection urinaire (Hooton *et al.*, 1997, Ronald, 2002).

Les pathogènes suivent dans 95% des cas une voie ascendante. L'infection commence par la colonisation de l'aire périurétrale par une souche uropathogène qui migre dans l'urètre en direction de la vessie. Cette progression peut se poursuivre dans l'uretère pour infecter les reins, comme le montre la figure 2 (Hagan *et al.*, 2009, Mulvey, 2002). L'adhérence est la première et plus importante étape dans l'établissement d'une infection, elle est dépendante de la combinaison de mécanismes d'adhérence propre à chaque souche bactérienne.

Ensuite, *Proteus* spp., *Klebsiella pneumoniae* et *Staphylococcus saprophyticus* produisent une uréase qui hydrolyse l'urée présente dans l'urine. Cette réaction libère de l'ammoniaque et du CO₂ causant une élévation du pH de l'urine, ce qui peut induire la formation de calculs dans les reins, mais aussi dans la vessie (Ronald, 2002). Le processus d'infection par *Escherichia coli* sera détaillé dans les prochaines parties.

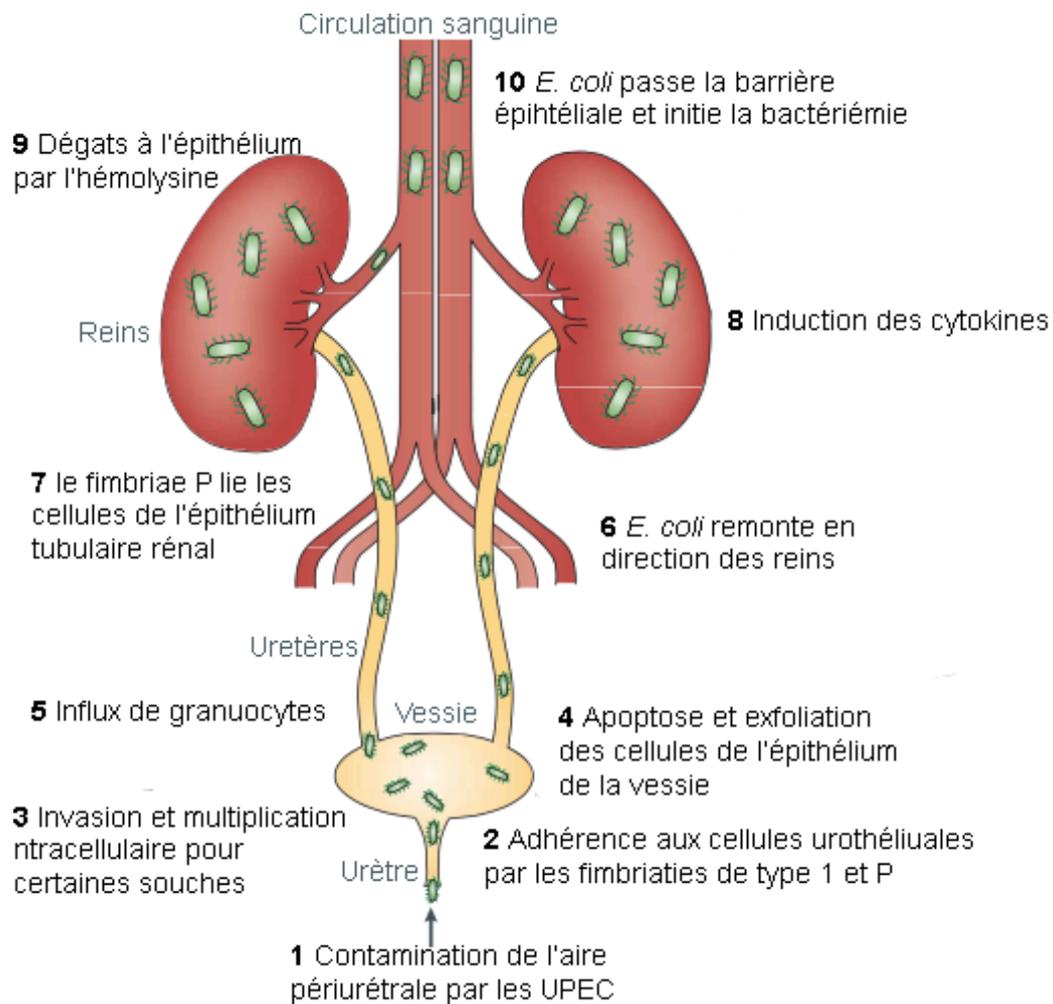


Figure 2. Pathogénèse de l'infection du tractus urinaire par *Escherichia coli* uropathogène. Les différentes étapes présentées indiquent le déroulement d'une infection du tractus urinaire ascendante par une souche d'*Escherichia coli* uropathogène. Adapté de Kaper *et al.* (2004).

1.3. Syndromes

L'UTI est classée selon le site d'infection, en effet, elle peut s'établir dans la vessie, dans les reins ou encore être asymptomatique. La cystite est le nom qu'on donne à l'infection du tractus urinaire quand celle-ci est localisée dans la vessie. Les symptômes sont plutôt légers : la miction devient plus fréquente, parfois urgente, accompagnée de douleurs pubiennes (Bower *et al.*, 2005, Hagan *et al.*, 2009, Hooton *et al.*, 1997, Mulvey, 2002).

Certaines bactéries sont également capables de remonter l'uretère depuis la vessie et de persister dans les reins, causant une pyélonéphrite (Hagan *et al.*, 2009, Wiles *et al.*, 2008b). Il s'agit d'une infection présentant des symptômes plus sérieux : douleurs dans les flancs, nausées, vomissements, fièvre, suées, voire malaises (Hagan *et al.*, 2009, Hooton *et al.*, 1997, Mulvey, 2002). Enfin, la pyélonéphrite cause une forte morbidité et peut être fatale. En effet, dans 30% des cas elle peut évoluer en bactériémie, c'est-à-dire que les pathogènes passent dans la circulation sanguine, pouvant évoluer en une septicémie, une infection généralisée de l'organisme (Bower *et al.*, 2005, Hagan *et al.*, 2009, Marrs *et al.*, 2005).

Certains patients ont une infection du tractus urinaire sans pour autant avoir de symptômes, on parle alors de bactériurie asymptomatique, ou ABU (Wiles *et al.*, 2008b). Elle est définie comme l'isolation de bactéries dans l'urine en quantité similaire à celle trouvée lors d'une infection symptomatique, mais sans signes génito-urinaires ou symptômes (Foxman, 2002).

1.4. Défenses innées de l'hôte

Dès que les bactéries uropathogènes entrent dans le tractus urinaire, elles sont confrontées aux défenses constitutives et induites de l'hôte, notamment au flux d'urine, aux molécules antibactériennes et aux cellules immunitaires effectrices, qui sécrètent des cytokines et des chimiokines (Haraoka *et al.*, 1999, Mulvey, 2002, Mysorekar *et al.*, 2002). La mise en place de ces défenses est déclenchée par l'adhérence des pathogènes sur les cellules épithéliales, étape initiale de l'infection (Schilling *et al.*, 2001, Svanborg *et al.*, 1999). En effet, les cellules à la surface de l'urothélium sont capables de sentir et de répondre à la composition du contenu de la vessie, mais aussi de traduire cette composition en signaux pour le reste de l'hôte (Svanborg *et al.*, 1999).

Un autre mécanisme de défense inné très important chez l'hôte est l'exfoliation. Il s'agit d'une apoptose des cellules infectées pour éliminer les bactéries adhérentes (Aronson *et al.*, 1988, Hagan *et al.*, 2009, Klumpp *et al.*, 2001, Mulvey *et al.*, 1998, Mysorekar *et al.*, 2002). Les cellules épithéliales recouvrant la surface lumenale de la vessie ayant normalement un taux de renouvellement très lent, les cellules sous-jacentes se retrouvent exposées. Elles se différencient et prolifèrent donc rapidement afin de remplacer les cellules manquantes (Mysorekar *et al.*, 2002). Cependant, ce mécanisme de défense de l'hôte peut aussi jouer en faveur des pathogènes. En effet, elle peut permettre leur dissémination dans les couches plus profondes de l'urothélium, conduisant à une cystite chronique.

1.5. Récurrence

Dans le cas des infections du tractus urinaire, les problèmes de récurrence sont rencontrés de plus en plus souvent. Les uropathogènes étant capables de lier, d'envahir les cellules superficielles de l'urothélium, et même de s'y répliquer, il est proposé que ces bactéries intracellulaires constituent une origine possible des infections récurrentes (Mulvey *et al.*, 2001, Schilling *et al.*, 2002, Schilling *et al.*, 2001).

En effet, elles sont capables de se développer et de former des communautés bactériennes intracellulaires, ou IBC, qui s'organisent de façon similaire à des biofilms (Anderson *et al.*, 2003, Justice *et al.*, 2004). Ces communautés intracellulaires constituent des abris pour les bactéries qui sont, de fait, protégées des antibiotiques (Justice *et al.*, 2004, Schilling *et al.*, 2002). Le temps de division des bactéries, très rapide, permet d'augmenter le nombre de pathogènes présents dans la vessie, facilitant leur dissémination et leur persistance. Enfin, les communautés bactériennes subissent des événements de maturation, les bactéries se différenciant simultanément. Puis, les bactéries sur les extrémités des communautés acquièrent des flagelles leur permettant d'être motiles, elles se dissocient de l'IBC pour aller coloniser d'autres cellules de l'urothélium, permettant la dissémination de l'infection (Justice *et al.*, 2004). Ces différentes étapes sont schématisées en figure 3. De plus, lors d'un suivi sur une année de femmes ayant subi une infection du tractus urinaire, la souche ayant causé la première infection était régulièrement isolée lors de récurrences. Il a même été possible de l'isoler jusqu'à 11 mois après l'épisode d'infection initiale (Ikaheimo *et al.*, 1996).

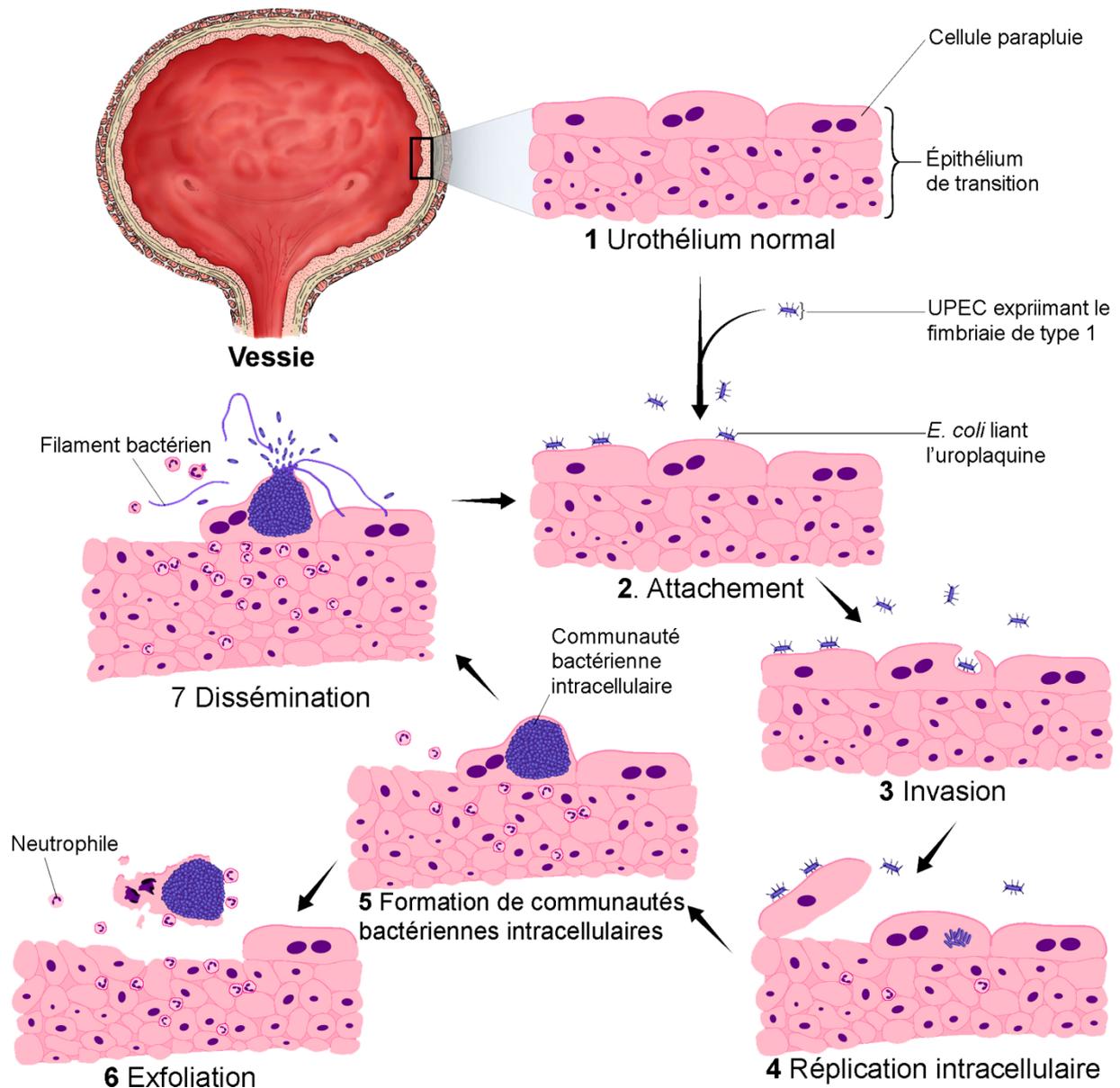


Figure 3. Formation de communautés bactériennes intracellulaires lors d'une infection du tractus urinaire par *Escherichia coli* uropathogène dans le modèle murin. Les différentes étapes présentées indiquent les différentes phases nécessaires à la formation des IBC par les pathogènes, représentés en violet, dans les cellules de l'épithélium, représentées en rose. Adapté de Rosen *et al.* (2007).

2. *Escherichia coli*

Escherichia coli est un bacille Gram-négatif non sporulant appartenant au genre *Escherichia* dans la famille des *Enterobacteriaceae*. Il s'agit d'une bactérie en forme de bâtonnet capable de motilité grâce à la présence de flagelles péritriches à sa surface, où se trouvent également des fimbriae et parfois une capsule (Nataro *et al.*, 2011, Stenutz *et al.*, 2006, Sussman, 1997). *E. coli* est capable de croître aussi bien en conditions aérobiques qu'anaérobiques (Nataro *et al.*, 2011, Stenutz *et al.*, 2006).

Membre de la flore intestinale normale de nombreux mammifères, dont l'homme, *Escherichia coli* colonise le tractus gastro-intestinal en quelques heures après la naissance de son hôte (Clermont *et al.*, 2000, Marrs *et al.*, 2005, Meng *et al.*, 2013, Sussman, 1997). Ils entretiennent ainsi une relation symbiotique. Cependant, cette espèce bactérienne étant très diversifiée, certaines souches sont pathogènes (Kaper *et al.*, 2004, Marrs *et al.*, 2005, Meng *et al.*, 2013).

2.1. Classification

Il existe de nombreuses façons de classer les souches d'*Escherichia coli*. Une première méthode tient compte des antigènes présents à la surface de la bactérie, il s'agit de la classification sérologique. Une deuxième se concentre sur les mutations subies par des gènes codants pour des enzymes, il s'agit de la classification phylogénétique. Ces deux méthodes principales sont présentées ci-dessous.

2.1.1. Classification sérologique

La surface des bactéries est un assemblage de protéines et polysaccharides composant les antigènes majeurs pouvant être utilisés pour identifier les isolats (Whitfield, 2009). C'est pour cette raison que Kauffmann a établi, en 1947, une méthode de classification en fonction de ces antigènes de surface (Hagan *et al.*, 2009, Nataro *et al.*, 1998). Chez *Escherichia coli*, cette classification est basée sur les antigènes somatiques O, flagellaires H et capsulaires K (Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 1998, Whitfield *et al.*, 1999, Wiles *et al.*, 2008b). L'antigène O est associé aux lipopolysaccharides, ou LPS, environ 180 antigènes O différents ont été identifiés (Poolman *et al.*, 2016, Whitfield, 2009, Whitfield *et al.*, 1999). L'antigène H correspond à la flagelline qui compose le flagelle permettant la mobilité bactérienne, actuellement 80 antigènes H ont été identifiés (Hagan *et al.*, 2009, Poolman *et al.*, 2016). Enfin, l'antigène K provient des polysaccharides capsulaires, il n'est donc présent que si la bactérie possède une capsule (Hagan *et al.*, 2009, Poolman *et al.*, 2016, Whitfield, 2009, Whitfield *et al.*, 1999).

L'antigène O définit le sérotype d'une souche tandis que la combinaison des antigènes O, H et K, définit le sérotype (Hagan *et al.*, 2009, Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 1998, Stenutz *et al.*, 2006). Beaucoup de combinaisons entre les trois antigènes sont possibles ce qui résulte en un nombre énorme de souches avec des profils immunologiques différents (Poolman *et al.*, 2016). Aussi, il semble que certains antigènes O et K confèrent un avantage de survie (Hagan *et al.*, 2009, Wiles *et al.*, 2008b).

Les antigènes sont identifiés par un test d'agglutination utilisant un antisérum, généralement de lapin, contenant des antigènes connus (Whitfield, 2009). Bien que cette technique soit très sensible, l'énorme variabilité des combinaisons antigéniques rend le sérotypage fastidieux et coûteux. Elle n'est donc effectuée que par des laboratoires spécialisés (Stenutz *et al.*, 2006).

2.1.2. Classification phylogénétique

La classification phylogénétique est une méthode un peu plus récente, basée sur la mobilité électrophorétique d'enzymes, puis évoluée pour se concentrer sur les gènes codants ces mêmes enzymes. Cette méthode de classification répartit les souches bactériennes dans sept groupes phylogénétiques : A, B1, B2, C, D, E et F (Clermont *et al.*, 2013).

2.1.2.1. Techniques utilisées

La MLEE, pour « Multilocus Enzyme Electrophoresis », est une méthode de caractérisation des organismes développée en 1966 et utilisée en premier lieu pour l'étude des populations de drosophiles, mais aussi humaines (Hubby *et al.*, 1966, Lewontin *et al.*, 1966, Stanley *et al.*, 2003). Elle est ensuite devenue une technique répandue dans la biologie évolutive des eucaryotes et a été appliquée aux microorganismes pour établir la structure génétique des populations naturelles de bactéries, puis utilisée dans le typage épidémiologique des bactéries et autres microorganismes (Stanley *et al.*, 2003).

Cette technique repose sur la mobilité de nombreuses enzymes intracellulaires constitutives lors d'une électrophorèse. En effet, la mobilité d'une enzyme varie en fonction de mutations subies par le gène qui la code, pouvant entraîner une substitution d'acide aminé dans sa séquence. Une telle mutation peut changer la charge nette de l'enzyme et donc modifier sa mobilité lors d'une électrophorèse. C'est la variation dans la migration d'enzymes constitutives qui permet donc de classer l'organisme dans les différents groupes phylogénétiques (Stanley *et al.*, 2003).

La MLST, pour « Multilocus Sequence Typing », est une adaptation de la technique MLEE, mais, plutôt que d'étudier les enzymes constitutives, cette technique se concentre sur les gènes qui les codent. Elle consiste en un séquençage de fragments de 13 gènes essentiels après les avoirs amplifiés par PCR. Elle permet ainsi de détecter un plus grand nombre de variations que la MLEE, car certaines mutations n'entraînent pas nécessairement la substitution d'un acide aminé (Clermont *et al.*, 2013, Maiden *et al.*, 1998).

Enfin, la méthode de Clermont est une méthode similaire à la MLST. Elle consiste en l'amplification par PCR de deux gènes, *chuA* et *yjaA* ainsi qu'un fragment d'ADN, TspE4.C2, un possible gène codant pour une lipase estérase. Cette méthode permet d'assigner les souches d'*E. coli* en fonction de la présence ou de l'absence de chaque fragment (Clermont *et al.*, 2000). Plus récemment, cette méthode a été améliorée par l'addition du gène *arpA*, permettant notamment de différencier les souches des groupes D et F (Clermont *et al.*, 2013).

2.1.2.2. Groupes phylogénétiques

Le groupe A est majoritairement constitué de souches commensales d'origine humaine. Le groupe B1, quant à lui, est constitué de souches principalement isolées depuis des mammifères non-primates. Le groupe B2 regroupe les souches virulentes isolées chez les primates, mais aussi chez l'homme. Le groupe C est composé de souches très proches du groupe B1 mais celles-ci sont identifiées comme appartenant au groupe A par le MLST. Le groupe D est constitué, lui aussi, de souches virulentes, mais avec moins de facteurs de virulence que celles du groupe B2. Le groupe E regroupe toutes les souches qui n'avaient pas été classées jusqu'à présent. Enfin, le groupe F est considéré comme un groupe sœur du groupe B2 (Clermont *et al.*, 2000, Clermont *et al.*, 2013, Herzer *et al.*, 1990, Lecointre *et al.*, 1998). Un arbre phylogénétique qualitatif, représentant la parenté entre chaque souche est représenté en figure 4.

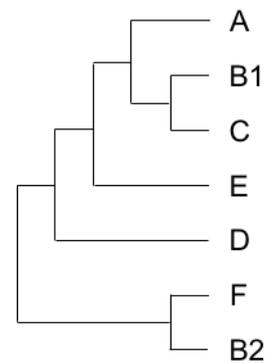


Figure 4. Arbre qualitatif représentant les différents groupes phylogénétiques dans lesquels les différentes souches *Escherichia coli* peuvent être classées. Adapté de Clermont *et al.* (2013).

2.2. Pathogénicité

Certains clones d'*Escherichia coli* ont pu acquérir des propriétés de virulence, leur permettant d'augmenter leur capacité d'adaptation à de nouveaux environnements et de causer des maladies. Ces propriétés, appelées facteurs de virulence, sont codées par des gènes se trouvant sur des plasmides qui, pour certains, se sont intégrés dans le génome bactérien (Kaper *et al.*, 2004). Cependant, un gène seul, ou un groupe de gènes codant pour un seul facteur de virulence complet, n'est pas toujours suffisant pour que la bactérie cause une maladie chez son hôte. En effet, c'est un ensemble de facteurs de virulence complémentaires qui, lorsqu'ils sont combinés, permettent de créer une interaction particulière avec l'hôte, occasionnant alors une maladie (Marrs *et al.*, 2005). Lorsque plusieurs souches d'une espèce bactérienne possèdent une combinaison de facteurs de virulence et un processus de pathogénèse commun, elles constituent un pathotype, capable de causer des maladies chez des sujets en bonne santé (Kaper *et al.*, 2004, Marrs *et al.*, 2005). Les pathotypes chez *E. coli* semblent également être des groupes clonaux partageant les mêmes antigènes O et H et provenant le plus souvent des groupes phylogénétiques B2 et D (Clermont *et al.*, 2013, Kaper *et al.*, 2004).

2.2.1. Pathotypes

Chez *Escherichia coli*, la pathogénicité de certaines souches est connue et établie. Les souches pathogènes les plus connues sont celles causant la diarrhée suite à des infections dans l'intestin, aussi appelées InPEC, pour intestinal pathogenic *E. coli*, il en existe six groupes qui ont été décrits, et présentés en figure 5, mais de nouveaux groupes semblent émerger (Marrs *et al.*, 2005, Nataro *et al.*, 1998). Il existe également des souches d'*E. coli* causant des infections en dehors de l'intestin : les ExPEC, pour extraintestinal pathogenic *E. coli* (Russo *et al.*, 2000). Ces souches colonisent le tractus digestif sans causer d'infection, mais elles peuvent causer des maladies si elles se retrouvent dans une autre niche, comme le sang, le système nerveux central ou encore le tractus urinaire (Wiles *et al.*, 2008b).

2.2.1.1. InPEC

Le groupe d'*Escherichia coli* entéropathogènes, EPEC, fut le premier pathotype décrit (Kaper *et al.*, 2004). Ces pathogènes sont une cause importante de diarrhée infantile pouvant être fatale dans les pays en développement (Levine, 1987, Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 1998, Sears *et al.*, 1996). Les EPEC sont reconnaissables par leur capacité à induire des lésions spécifiques, appelées attachement / effacement, après adhésion à une cellule intestinale, le pathogène efface les microvillosités (Kaper *et al.*, 2004, Levine, 1987, Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 1998, Sears *et al.*, 1996, Stenutz *et al.*, 2006).

Les *Escherichia coli* entérotoxigéniques, ETEC, constituent une cause majeure de diarrhée aqueuse infantile dans les pays en développement (Kaper *et al.*, 2004, Levine, 1987, Meng *et al.*, 2013, Sears *et al.*, 1996, Stenutz *et al.*, 2006). C'est également le pathogène le plus fréquemment mis en cause dans les cas de diarrhée du voyageur (Kaper *et al.*, 2004, Levine, 1987, Meng *et al.*, 2013, Stenutz *et al.*, 2006). Leur particularité est la production d'une toxine thermostable et / ou d'une toxine thermolabile (Kaper *et al.*, 2004, Levine, 1987, Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 1998, Sears *et al.*, 1996, Stenutz *et al.*, 2006).

Reconnues comme pathogènes humains pour la première fois en 1982, les souches entérohémorragiques, EHEC, causent une diarrhée qui peut être sanglante, appelée colite hémorragique, et leurs toxines peuvent aussi induire un syndrome urémique hémolytique (Kaper *et al.*, 2004, Levine, 1987, Meng *et al.*, 2013). Enfin, les vérotoxines, aussi appelées shigatoxines, sont un de leurs facteurs de virulence clé (Kaper *et al.*, 2004, Sears *et al.*, 1996, Stenutz *et al.*, 2006).

Les *Escherichia coli* entéroaggrégatives, EAEC, sont caractérisées par leur adhésion dans une configuration de briques empilées sur les cellules épithéliales humaines, HEp-2 (Nataro *et al.*, 2011, Nataro *et al.*, 1998). Elles causent des diarrhées persistantes, aussi bien chez les adultes que chez les enfants, dans les pays développés et en développement (Kaper *et al.*, 2004, Nataro *et al.*, 2011, Stenutz *et al.*, 2006).

Les *Escherichia coli* entéroinvasives, EIEC, sont très fortement liées à *Shigella* spp., aussi bien sur le plan biochimique que pathogénique (Kaper *et al.*, 2004, Stenutz *et al.*, 2006). Ces souches causent une diarrhée aqueuse, voire une dysenterie similaire à celle causée par *Shigella* spp., suite à une invasion des cellules épithéliales du colon (Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 2011, Nataro *et al.*, 1998, Sears *et al.*, 1996).

Comme leur nom l'indique, les *Escherichia coli* à adhérence diffuse, DAEC, adhèrent en regroupements diffus sur les cellules épithéliales humaines HEp-2 ou HeLa (Kaper *et al.*, 2004, Meng *et al.*, 2013, Stenutz *et al.*, 2006). Ces souches sont associées à la diarrhée chez de très jeunes enfants de moins d'un an (Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 1998). Ce groupe de pathogènes a été peu étudié et les facteurs de virulences qui y sont associés ne sont pas bien connus (Meng *et al.*, 2013, Nataro *et al.*, 2011, Stenutz *et al.*, 2006).

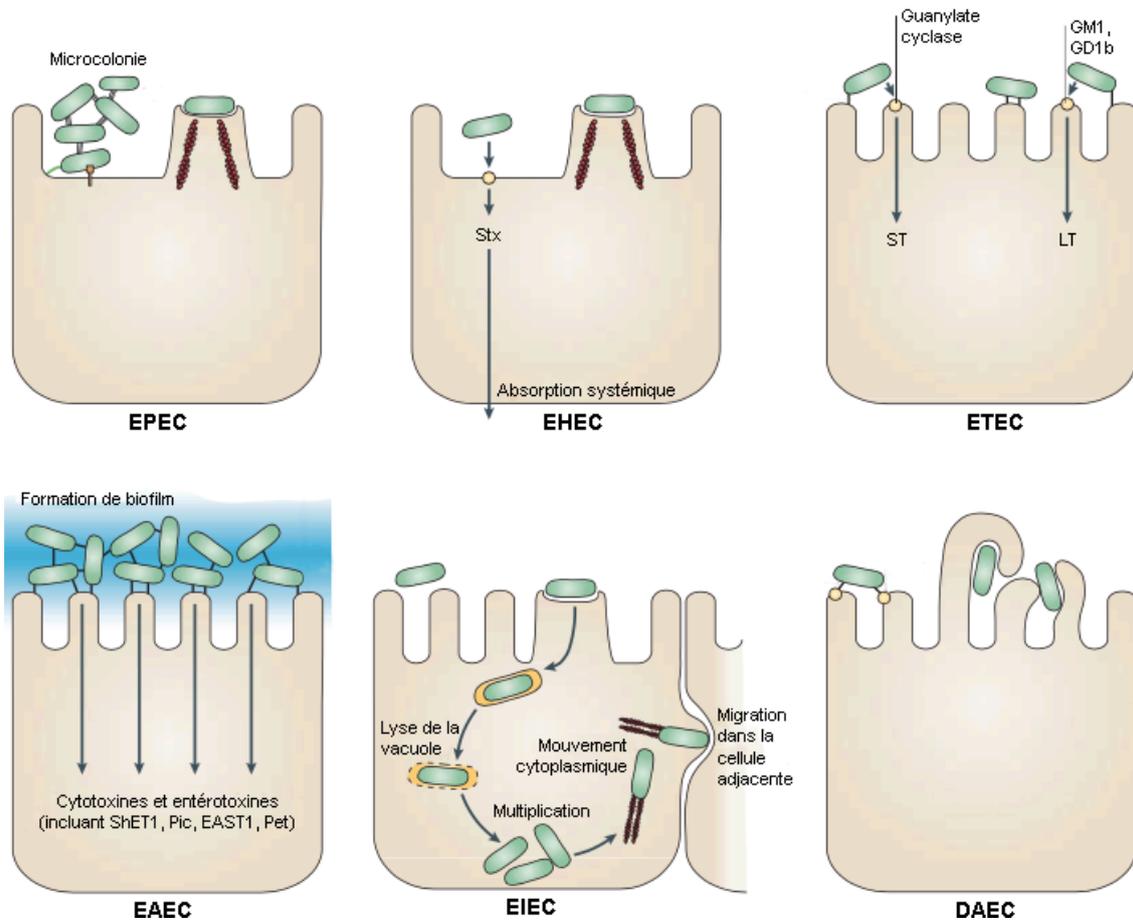


Figure 5. Modes d'action des *Escherichia coli* diarrhéiques. Les différentes pathogénèses pour chaque type d'InPEC, représentés en vert, sont ici décrits avec leurs facteurs de virulence clé. Adapté de Kaper *et al.* (2004).

2.2.1.2. ExPEC

Les souches décrites ci-dessous font partie des ExPEC, les souches d'*Escherichia coli* qui s'avèrent pathogènes lorsqu'elles se retrouvent en dehors du tractus intestinal (Russo *et al.*, 2000, Wiles *et al.*, 2008b).

Certaines souches d'*E. coli* sont capables de causer la méningite néonatale, les NMEC, neonatal meningitis *E. coli*. Elles sont capables de se propager par le sang et de passer la barrière hématoencéphalique (Kaper *et al.*, 2004).

Il existe également des souches d'*E. coli* capables de causer des infections du tractus urinaire, les UPEC, urinary tract pathogenic *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004). Les UPEC sont la cause majeure des infections du tractus urinaire acquise en communauté (Jellheden *et al.*, 1996, Nataro *et al.*, 2011). Ces souches d'*E. coli* possèdent une grande variété de facteurs de virulence qui peuvent être codés aussi bien sur des plasmides que sur le chromosome bactérien, dans des blocs de gènes, appelés îlots de pathogénicité, absents des souches qui sont strictement fécales (Nataro *et al.*, 2011). Les souches appartenant aux UPEC présentent un nombre limité d'antigènes O. Cependant, il n'existe pas de profil phénotypique spécifique permettant de définir les UPEC (Johnson *et al.*, 2005, Nataro *et al.*, 2011).

2.2.2. Facteurs de virulence

Les souches d'*E. coli* pathogènes se différencient des souches commensales par la présence de matériel génétique supplémentaire, dont les produits, les facteurs de virulence, contribuent à la pathogénèse. Ces gènes peuvent être trouvés sur des plasmides, appelés plasmides de virulence, ou bien regroupés sur le chromosome bactérien, formant des îlots de pathogénicité, ou PAI (Hacker *et al.*, 2000, Hagan *et al.*, 2009). Les îlots, probablement acquis par les pathogènes grâce à des transferts de gènes horizontaux, sont de grandes régions génomiques, de 10 kb à 200 kb (Hacker *et al.*, 2000). Aussi, leur pourcentage en guanine et cytosine est souvent différent du reste du génome de la bactérie, ce qui les rend plus facilement repérables (Hacker *et al.*, 2000, Hagan *et al.*, 2009). Ils sont souvent flanqués de petites séquences directement répétées, possiblement générées lors de leur intégration par recombinaison. Celle-ci a généralement lieu à proximité d'un gène codant pour un ARN de transfert, ou ARNt, servant souvent de site d'intégration pour les ADN étrangers (Hacker *et al.*, 2000).

Les UPEC codent donc divers facteurs de virulence, mais, pour le moment, aucun facteur de virulence spécifique ou combinaison de facteurs ne permet d'identifier ou de définir les UPEC (Bower *et al.*, 2005). De plus, même si certains facteurs de virulence contribuent au potentiel pathogène, ces mêmes facteurs peuvent être importants pour la survie et la réplication dans certaines niches écologiques particulières pour des souches non pathogènes, auquel cas ils ne créent pas de potentiel pathogène, mais sont essentiels à la survie (Hacker *et al.*, 2000). Les principaux facteurs de virulence associés aux UPEC sont représentés dans la figure 6 ci-dessous et listés dans le tableau 1 ci-contre.

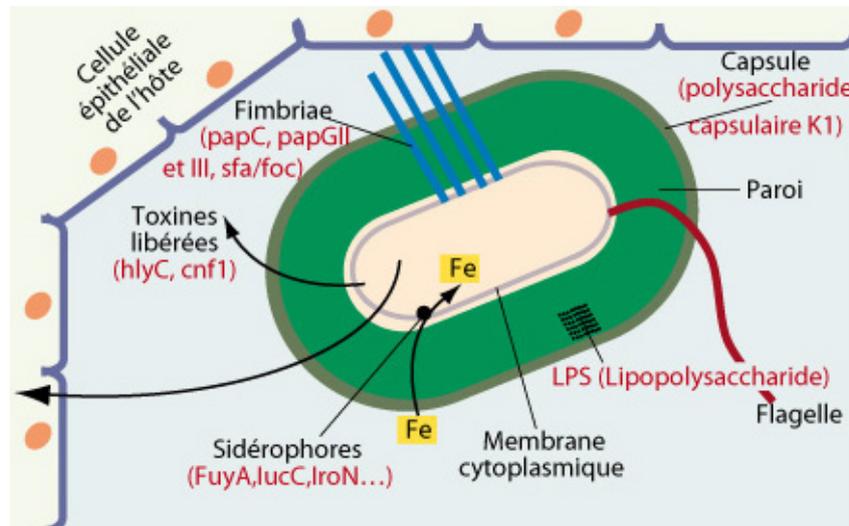


Figure 6. Principaux facteurs de virulence associés aux ExPEC. Les fimbriae permettent l'adhérence de la bactérie aux cellules de l'hôte. Beaucoup de bactéries produisent et sécrètent des toxines. Les sidérophores sont des systèmes d'acquisition du fer avec une haute affinité. Le LPS est une molécule toxique exposée à l'environnement de la bactérie lorsque celle-ci ne possède pas de capsule. Le flagelle permet la mobilité de la bactérie. Enfin, la capsule n'est pas présente chez toutes les souches bactériennes mais permet une meilleure résistance au sérum. (Jauréguy, 2009).

Tableau 1. Facteurs de virulence associés aux UPEC

Facteur de virulence	Gène ou opéron	Rôles dans les infections du tractus urinaire	Sources
Adhésines		<ul style="list-style-type: none"> - Nécessaires à l'adhésion, première étape du processus infectieux - Attachement aux cellules et tissus de l'hôte, liaison entre bactéries 	(Hacker <i>et al.</i> , 2000, Hagan <i>et al.</i> , 2009)
Fimbriae de type 1	<i>fim</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison aux glycolipides et glycoprotéines contenant du mannose, UPIa et UPIb dans le tractus urinaire, via l'adhésine FimH - Déclenchement de l'internalisation des pathogènes dans les cellules de l'urothélium - Stimulation de la production de cytokines et de l'exfoliation 	(Hagan <i>et al.</i> , 2009, Hung <i>et al.</i> , 2002, Jones <i>et al.</i> , 1995, Klumpp <i>et al.</i> , 2001, Martinez <i>et al.</i> , 2000, Thanassi <i>et al.</i> , 2007, Wu <i>et al.</i> , 1996)
Fimbriae P	<i>pap</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Adhésion aux cellules rénales, via l'adhésine PapG 	(Hacker <i>et al.</i> , 2000, Hagan <i>et al.</i> , 2009, Marrs <i>et al.</i> , 2005, Mulvey, 2002, Mulvey <i>et al.</i> , 2000, Thanassi <i>et al.</i> , 2007)
Adhésines de la famille Dr	<i>dra</i>	<ul style="list-style-type: none"> - Liaison au collagène de type IV présent dans l'épithélium de la vessie 	(Hagan <i>et al.</i> , 2009, Johnson <i>et al.</i> , 2005, Marrs <i>et al.</i> , 2005, Mulvey, 2002, Mulvey <i>et al.</i> , 2000, Thanassi <i>et al.</i> , 2007)

Fimbriae S	<i>sfa</i>	- Liaison aux récepteurs spécifiques à l'acide sialique des cellules urothéliales	(Hacker <i>et al.</i> , 2000, Marrs <i>et al.</i> , 2005, Mulvey, 2002, Thanassi <i>et al.</i> , 2007)
Fimbriae F1C	<i>foc</i>	- Adhésion aux épithéliums tubulaires et vasculaires dans les reins	(Hagan <i>et al.</i> , 2009, Johnson <i>et al.</i> , 2005, Thanassi <i>et al.</i> , 2007, Wiles <i>et al.</i> , 2008b)
Acquisition du fer		- Essentielle à la survie bactérienne - Contribue à la virulence des pathogènes	(Hacker <i>et al.</i> , 2000)
Entérobactine	<i>ent</i> (synthèse) <i>fep / iha</i> (transport)	- Sidérophore	(Payne <i>et al.</i> , 2004, Porcheron <i>et al.</i> , 2013, Winkelmann, 2002)
Salmochéline	<i>iro</i>	- Sidérophore	(Payne <i>et al.</i> , 2004, Winkelmann, 2002)
Aérobactine	<i>iuc</i> (synthèse) <i>iut / fhu</i> (transport)	- Sidérophore	(Hacker <i>et al.</i> , 2000, Payne <i>et al.</i> , 2004, Porcheron <i>et al.</i> , 2013, Winkelmann, 2002)

Yersiniabactine	<i>ybt</i> (synthèse) <i>fyuA</i> (transport)	- Sidérophore	(Perry, 2004, Porcheron <i>et al.</i> , 2013)
ChuA	<i>chu / hma</i>	- Récepteur liant l'hème pour acquérir du fer	(Payne <i>et al.</i> , 2004, Porcheron <i>et al.</i> , 2013)
Toxines			
Hémolysine α	<i>hly</i>	- Insertion dans la membrane cellulaire - Formation de pores et lyse de nombreux types cellulaires	(Hacker <i>et al.</i> , 2000)
CNF1	<i>cnf1</i>	- Contribution à l'uropathogénicité incertaine	(Hagan <i>et al.</i> , 2009, Landraud <i>et al.</i> , 2003)
Autotransporteurs			
Sat	<i>sat</i>	- Cytotoxine, affaiblissement des jonctions serrées, autophagie	(Hagan <i>et al.</i> , 2009, Ruiz-Perez <i>et al.</i> , 2014)
Vat / Vat-like	<i>vat</i>	- Cytotoxine	(Ruiz-Perez <i>et al.</i> , 2014)
PicU	<i>picU</i>	- Mucinase	(Parham <i>et al.</i> , 2004)

3. Hémolysine d'*Escherichia coli*

L'hémolysine est un polypeptide de 1024 acides aminés, pesant 110 kDa (Felmlee *et al.*, 1985, Ostolaza *et al.*, 1991, Thomas *et al.*, 2014). Son domaine C-terminal possède un signal de sécrétion non-clivé ainsi qu'un domaine contenant 11 à 17 répétitions riches en glycine et aspartate qui lieront le calcium (Felmlee *et al.*, 1988, Kenny *et al.*, 1991, Linhartova *et al.*, 2010, Welch, 2001). Ces répétitions, appelées RTX pour « repeats in toxin », sont spécifiques à une famille de toxines du même nom, les toxines RTX qui seront décrites dans le paragraphe suivant (Linhartova *et al.*, 2010, Ristow *et al.*, 2016, Welch, 2001). Son domaine N-terminal, quant à lui, est un domaine d'interaction supposé grâce à son hélice α amphipatique (Linhartova *et al.*, 2010, Ludwig *et al.*, 1991). L'hémolysine est une cytolysine pour une grande variété de cellules nucléées de mammifères, notamment les cellules épithéliales du tractus urinaire humain (Hagan *et al.*, 2009, Ristow *et al.*, 2016). C'est pourquoi elle est considérée comme un facteur de virulence chez les UPEC, qui la produisent plus communément que les souches fécales (Brooks *et al.*, 1980, Cooke *et al.*, 1975, Wiles *et al.*, 2013).

3.1. Toxines RTX

Les toxines RTX constituent une famille de protéine possédant une grande diversité d'activités et de masses moléculaires, allant de 40 kDa à environ 600 kDa, produites par un grand nombre de bactéries Gram négatives (Linhartova *et al.*, 2010, Welch, 2001). Leur caractéristique commune est la présence de répétitions riches en glycine et aspartate localisées à leur extrémité C-terminale qui constituent de nombreux sites de liaison pour des ions calcium, Ca^{2+} (Linhartova *et al.*, 2010, Welch, 1991, Welch, 2001).

Ces toxines sont similaires sur de nombreux points. Au niveau génétique, elles sont toutes codées depuis un locus qui contient les gènes codant pour l'activateur de la toxine, la protoxine et les protéines nécessaires à son exportation. De plus, leur signal de sécrétion, qui n'est pas clivé, se trouve dans les 60 derniers acides aminés du domaine C-terminal de la toxine (Linhartova *et al.*, 2010).

Elles sont toutes synthétisées sous la forme d'une protoxine qui doit être activée par le produit du gène *rtxC*. Cette activation consiste en une acylation de deux résidus lysines conservés avant exportation. Même si elle est essentielle à l'activité biologique de la toxine, le rôle exact de cette étape n'est pas encore totalement compris (Linhartova *et al.*, 2010, Stanley *et al.*, 1998, Uhlen *et al.*, 2000).

Autre point commun, le système de sécrétion de type 1 (Linhartova *et al.*, 2010, Welch, 2001). Il consiste en la translocation de la toxine à travers un canal de sécrétion transmembranaire en une seule étape (Linhartova *et al.*, 2010). Il est constitué de transporteurs ABC dédiés qui reconnaissent le signal de sécrétion, non clivable, en position C-terminale de la toxine, puis induisent sa translocation depuis le cytoplasme bactérien directement dans l'espace extracellulaire, sans passer par un intermédiaire périplasmique (Linhartova *et al.*, 2010, Welch, 2001). La toxine RTX est transloquée sans être repliée ou alors dans une conformation relativement souple (Kenny *et al.*, 1991). Ce système de sécrétion, qui est aussi utilisé pour beaucoup d'autres molécules, sera expliqué plus en détail dans le cas de la sécrétion de l'hémolysine.

De plus, les répétitions riches en glycine et aspartate sont des sites de liaison pour les ions calcium. En effet, les ions Ca^{2+} sont nécessaires à l'activité des toxines RTX (Boehm *et al.*, 1990a, Boehm *et al.*, 1990b, Short *et al.*, 1971). Le calcium se lie à la toxine une fois que celle-ci a été sécrétée puisque sa concentration intracellulaire est trop faible, inférieure à 100 nM (Linhartova *et al.*, 2010).

Le domaine N-terminal de ces toxines est aussi très important, puisqu'il semble être responsable de la formation de pores dans les membranes des cellules ciblées, notamment grâce à son hydrophobicité (Linhartova *et al.*, 2010). Ces pores peuvent aussi bien se former dans la membrane d'un grand nombre de types cellulaires que sur des bicouches lipidiques entièrement synthétiques (Benz *et al.*, 1994, Bhakdi *et al.*, 1989, Bhakdi *et al.*, 1986, Menestrina *et al.*, 1987).

Enfin, un des effets principaux des toxines RTX est l'élévation et la modulation des concentrations des ions calcium intracellulaires, ce qui est une stratégie très répandue chez les bactéries pathogènes pour manipuler les cellules de l'hôte (Jorgensen *et al.*, 1983, TranVan Nhieu *et al.*, 2004). En effet, les niveaux de calcium cytoplasmiques sont très étroitement contrôlés puisqu'ils constituent une voie de signalisation importante régulant de nombreux processus cellulaires (Linhartova *et al.*, 2010). Les toxines RTX sont donc capables de causer des influx importants d'ions Ca^{2+} pouvant conduire à une lyse osmotique, à la destruction du cytosquelette ou encore à des séquelles nécrotiques, mais aussi induire la sécrétion de médiateurs inflammatoires, voire l'apoptose ou la nécrose (Welch, 2001).

3.2. Génétique

L'hémolysine est codée par l'opéron *hlyCABD*, représenté en figure 7 ci-dessous, contenant l'activateur, la protoxine et les protéines de son système de sécrétion (Hagan *et al.*, 2009, Wiles *et al.*, 2013). La transcription de cet opéron peut donner deux ARNm messagers différents contenant *hlyCABD*, ou bien *hlyCA*, qui est plus stable (Welch *et al.*, 1988). Cet opéron est retrouvé chez 31 % à 48 % des UPEC et généralement localisé dans le même îlot de pathogénicité que le fimbriae P et le facteur cytotoxique nécrosant, CNF1 (Cooke *et al.*, 1975, Hagan *et al.*, 2009, Marrs *et al.*, 2002).



Figure 7. Opéron *hly* codant pour l'hémolysine. Les boîtes grises représentent les séquences régulatrices recrutant RfaH. Le gène *hlyC* est impliqué dans l'activation de l'hémolysine, codée par le gène *hlyA*. L'exportation de la protéine s'effectue à l'aide des produits des gènes *hlyB* et *hlyD*. (Thomas *et al.*, 2014).

Le gène *hlyC* code pour une acyltransférase qui a pour rôle d'activer la protoxine : pro-HlyA (Stanley *et al.*, 1998, Stanley *et al.*, 1994, Wiles *et al.*, 2013). L'étape de maturation d'HlyA par HlyC consiste en deux étapes. Tout d'abord, HlyC forme un complexe intermédiaire avec une protéine porteuse d'acides gras, ou acyle-ACP, seule donneuse d'acides gras utilisée par HlyC. La formation de ce complexe intermédiaire permet de transférer l'acide gras depuis l'acyle-ACP à HlyC. C'est ensuite sous cette forme intermédiaire que HlyC transfère l'acide gras à HlyA, mais sans former de complexe avec la protoxine (Stanley *et al.*, 1994, Worsham *et al.*, 2005, Worsham *et al.*, 2001).

L'acylation a lieu sur deux résidus lysines, Lys⁵⁶⁴ et Lys⁶⁹⁰, et des acides gras de longueur différente peuvent être utilisés dépendamment de ce qui est disponible dans la bactérie (Lim *et al.*, 2000, Stanley *et al.*, 1998, Stanley *et al.*, 1994, Wiles *et al.*, 2013). Cependant, aucune différence dans l'activité hémolytique n'a été observée en fonction de l'acide gras utilisé (Trent *et al.*, 1998). Enfin, même si l'absence d'acylation n'empêche pas la production ni la sécrétion de l'hémolysine, cette étape est essentielle à son activité biologique (Stanley *et al.*, 1998, Stanley *et al.*, 1994).

Le gène *hlyA* code pour un polypeptide de 110 kDa, ou 1024 résidus, qui ne possède pas d'activité biologique (Felmlee *et al.*, 1985, Hagan *et al.*, 2009, Soloaga *et al.*, 1996). La pro-hémolysine est tout de même capable de lier les bicouches lipidiques de la même façon que l'hémolysine (Soloaga *et al.*, 1996). Comme expliqué précédemment c'est l'acylation, par HlyC, des résidus Lys⁵⁶⁴ et Lys⁶⁹⁰ qui est essentielle à la maturation de HlyA, dont la structure est montrée en figure 8 ci-dessous (Soloaga *et al.*, 1996, Stanley *et al.*, 1998). Enfin, contrairement à la plupart des protéines dont le signal de sécrétion est clivé et situé à l'extrémité N-terminale, sa séquence de sécrétion, qui n'est pas clivée, est située à son extrémité C-terminale (Felmlee *et al.*, 1985).

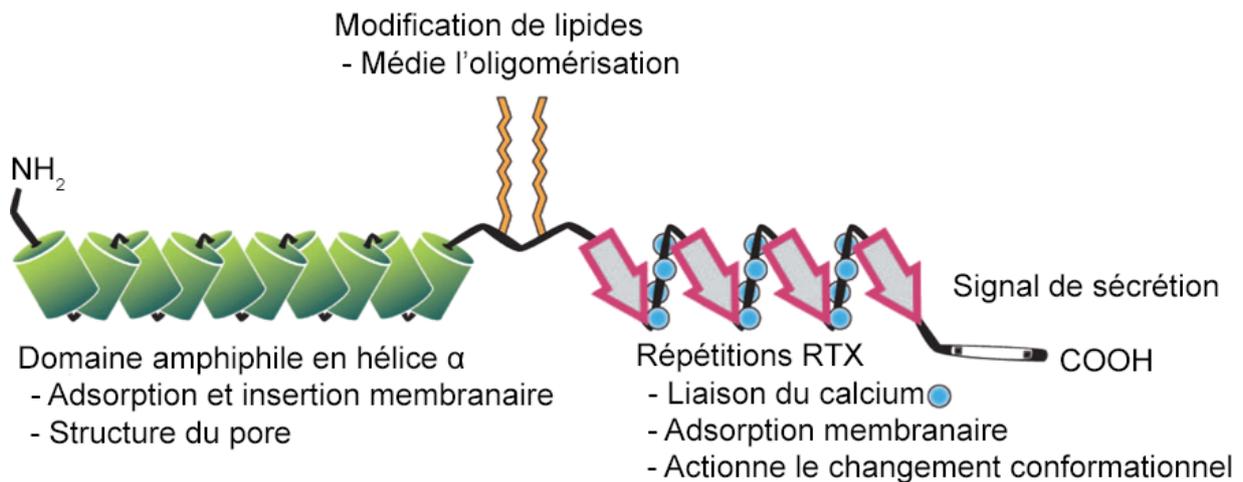


Figure 8. Structure et fonction des différents domaines de l'hémolysine. Le domaine N-terminal est une hélice α amphiphile, représentée par les cylindres verts, jouant un rôle dans l'adsorption et l'insertion dans la membrane de la cellule cible mais aussi dans la structure du pore formé. En orange sont représentés les lipides ajoutés par HlyC permettant l'activation de la toxine. Ensuite les répétitions RTX, représentées par les flèches grises et roses, sont le lieu de liaison du calcium, représenté par les sphères bleues, permettant le changement conformationnel de la toxine. Ces répétitions jouent aussi un rôle dans l'adsorption membranaire. Enfin le signal de sécrétion est en C-terminal de la toxine, représenté en blanc. Adapté de Wiles *et al.* (2013).

Le gène *hlyB* code pour une protéine de la membrane interne, faisant face au cytoplasme. Cette protéine est une partie essentielle du système de sécrétion de type 1 spécifique à HlyA et lie l'ATP (Hagan *et al.*, 2009, Schulein *et al.*, 1992). HlyB fait 66 kDa et constitue en réalité la moitié d'un transporteur (Schmitt *et al.*, 2003, Thomas *et al.*, 2014). En effet, c'est sa liaison avec l'ATP qui induit sa dimérisation et donc le rend fonctionnel dans son activité ATPase, nécessaire à la translocation de l'hémolysine (Zaitseva *et al.*, 2005).

Le gène *hlyD* code pour une protéine de 53 kDa ancrée à la membrane interne de la bactérie (Schulein *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 2014). Peu de données structurales sont disponibles, les avis divergent par exemple à propos de son oligomérisation. Les premières données suggéraient que HlyD s'organise en trimères, tout comme TolC (Thanabalu *et al.*, 1998). Mais de nouvelles études semblent plutôt indiquer que HlyD est actif sous forme d'un hexamère servant alors d'interface entre HlyB, dimérique, et TolC, trimérique (Lee *et al.*, 2012).

3.3. Régulation

La régulation de l'opéron *hly* est peu connue, mais divers facteurs environnementaux influencent l'expression des facteurs de virulence chez les bactéries pathogènes. Dans le cas de l'hémolysine, l'osmolarité de l'environnement de la bactérie semble en influencer l'expression. En effet, en conditions de faible osmolarité, comme dans les tissus rénaux, l'expression des gènes *hlyCABD* est forte alors qu'en conditions de forte osmolarité, dans l'urine par exemple, cette expression est réduite. Il a aussi été montré que la température pourrait réguler l'expression de l'hémolysine, en effet, les bactéries incubées à 20°C n'expriment pas d'hémolysine de façon détectable par un western blot (Mourino *et al.*, 1994).

Aussi, il existe deux sites de liaison pour la protéine H-NS proche de l'opéron de l'hémolysine. La liaison de H-NS sur l'ADN génère un effet de compaction généralisé, obstruant ainsi l'accès de l'ARN polymérase. La flexibilité de l'ADN augmentant à faible température, H-NS a donc une meilleure affinité de régulation de l'hémolysine à 25°C qu'à 37°C, c'est une explication possible de ce qui a été expliqué dans le paragraphe précédent (Madrid *et al.*, 2002).

Enfin, la protéine RfaH a été montrée comme aidant dans la production de l'hémolysine (Bailey *et al.*, 1992, Wandersman *et al.*, 1993). En effet, la présence d'une séquence appelée JUMPstart environ 300 paires bases avant le début du gène *hlyC*, ainsi que RfaH, permet d'améliorer l'élongation de la transcription de l'opéron *hlyCABD* (Leeds *et al.*, 1996, Leeds *et al.*, 1997).

3.4. Sécrétion dans le milieu extracellulaire

Chez les bactéries Gram-négatives, les protéines destinées à la surface cellulaire ou à l'environnement doivent traverser la membrane interne, le périplasme puis la membrane externe. Pour cela les bactéries ont développé différentes voies de sécrétion. Elles consistent en de gros assemblages de plusieurs protéines transmembranaires, ou bien en un mécanisme en deux étapes utilisant des intermédiaires périplasmiques (Koronakis *et al.*, 2004, Linhartova *et al.*, 2010).

Le système de sécrétion de type 1 consiste en une translocation des protéines depuis le cytoplasme vers le milieu extracellulaire au travers d'un canal enjambant toute l'enveloppe bactérienne (Andersen *et al.*, 2001, Koronakis *et al.*, 2000, Linhartova *et al.*, 2010, Thomas *et al.*, 2014). Ce mode de sécrétion nécessite trois protéines, à savoir un transporteur ABC et une protéine de fusion membranaire, tous deux liés à la membrane interne, ainsi qu'une protéine liée à la membrane externe (Linhartova *et al.*, 2010, Thomas *et al.*, 2014). Le transporteur ABC, pour « ATP Binding Cassette », possède deux domaines transmembranaires hydrophobes, qui sont liés à la membrane interne, et deux domaines cytoplasmiques de liaison nucléotidiques hydrophiles, qui lient l'ATP et le substrat à transloquer (Kerr, 2002). La protéine de fusion membranaire, liée à la membrane interne, s'étend sur le périplasme, permettant ainsi d'être en contact à la fois avec le transporteur ABC et la protéine de la membrane externe, agissant comme un adaptateur entre ces deux protéines (Andersen *et al.*, 2001, Linhartova *et al.*, 2010). Ces protéines associées à la membrane interne sont spécifiques au substrat et sont codées sur le même opéron que celui-ci (Koronakis *et al.*, 2004, Letoffe *et al.*, 1996). La protéine de la membrane externe est généralement TolC, ou bien un homologue de la même famille de pompes à efflux, codée à l'extérieur de l'opéron du substrat. Cette protéine trimérique est essentielle à l'exportation de protéines, mais aussi à l'efflux de composés antibactériens et molécules inhibitrices (Koronakis *et al.*, 2004, Koronakis *et al.*, 1997). TolC forme un canal dans la membrane externe de la bactérie, où l'extrémité extracellulaire est ouverte et l'extrémité périplasmique est fermée (Koronakis *et al.*, 2000). Elle forme une partie intégrante du système de sécrétion de type 1, il ne s'agit pas d'un pore que traverse le polypeptide pour rejoindre le milieu extracellulaire. En son absence, il n'y a pas de « demi-translocation ». En effet, dans une souche où TolC est absent, le substrat reste dans le cytoplasme (Balakrishnan *et al.*, 2001, Koronakis *et al.*, 1997).

La sécrétion du substrat par le système de sécrétion de type 1 est un phénomène ordonné, représenté en figure 9 ci-contre. En effet, c'est la reconnaissance du substrat par le transporteur ABC, interagissant avec la protéine de fusion membranaire, qui entraîne le recrutement de TolC (Koronakis *et al.*, 2004, Letoffe *et al.*, 1996). L'entrée périplasmique de TolC subit ensuite un changement conformationnel, stabilisé par le complexe protéique de la membrane interne, pour permettre le passage du substrat dans un état non replié (Andersen *et al.*, 2001, Koronakis *et al.*, 2004, Koronakis *et al.*, 1997, Koronakis *et al.*, 2000). Une fois l'exportation du substrat terminée, les différentes protéines retournent à un état indépendant (Thanabalu *et al.*, 1998). Ce mécanisme de sécrétion a besoin d'énergie provenant de la force proton motrice, mais aussi de l'hydrolyse d'ATP par le transporteur ABC (Koronakis *et al.*, 1991, Thomas *et al.*, 2014).

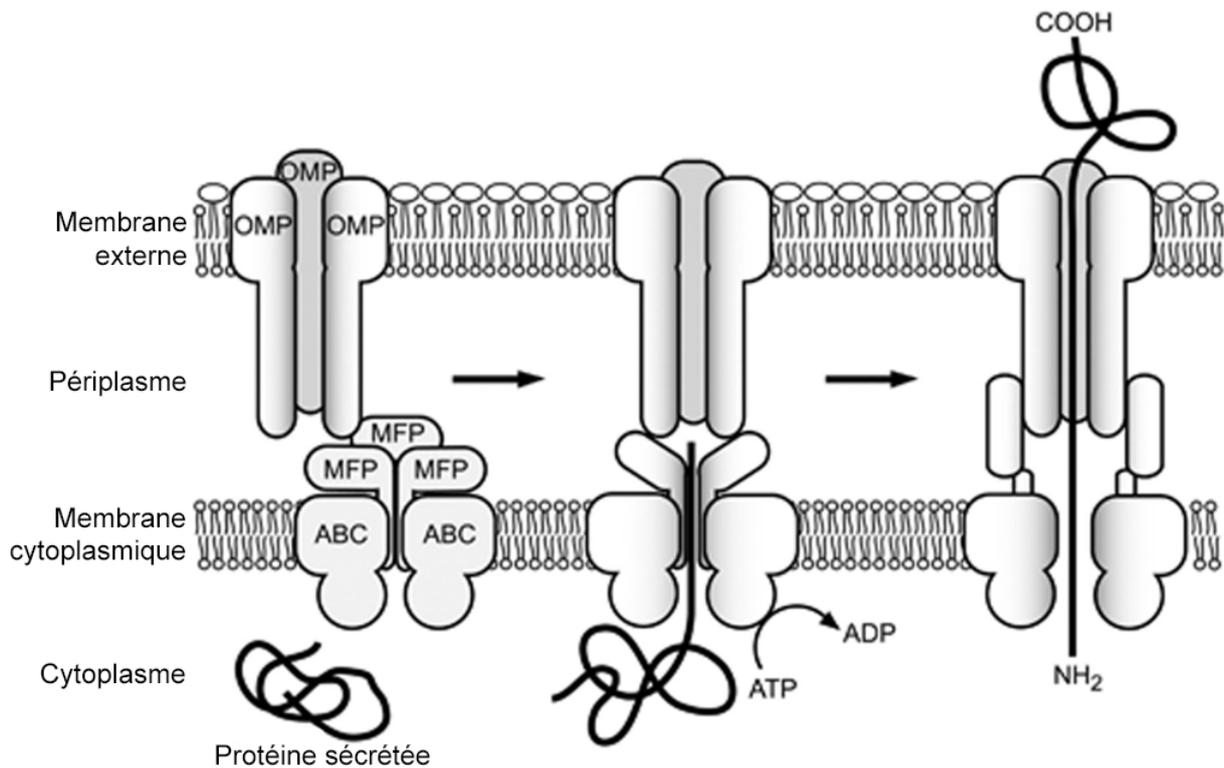


Figure 9. Organisation et fonctionnement du système de sécrétion de type 1. Le transporteur ABC reconnaît le signal de sécrétion de la protéine ce qui entraîne le recrutement de la protéine de la membrane externe, OMP, par la protéine de fusion membranaire, MFP. Un canal est donc formé entre les trois protéines permettant la sécrétion en une seule étape de la protéine. Adapté de Linhartova *et al.* (2010).

Dans le cas de l'hémolysine, il a été expliqué plus haut que l'opéron *hlyCABD* codait pour le substrat, HlyA, le transporteur ABC, HlyB et pour la protéine de fusion membranaire, HlyD (Hagan *et al.*, 2009, Kenny *et al.*, 1991, Linhartova *et al.*, 2010, Ristow *et al.*, 2016, Schulein *et al.*, 1992, Thomas *et al.*, 2014, Wiles *et al.*, 2013). Ici la protéine liée à la membrane externe est TolC, codée hors de l'opéron *hly* (Linhartova *et al.*, 2010, Schulein *et al.*, 1992). HlyD forme un complexe avec HlyB reconnaissant spécifiquement le signal de sécrétion en C-terminal de la protéine HlyA, activée ou non (Gray *et al.*, 1986, Linhartova *et al.*, 2010, Schulein *et al.*, 1992, Thanabalu *et al.*, 1998, Thomas *et al.*, 2014). Suite à la liaison d'HlyA, HlyD lie TolC et en induit le changement conformationnel pour permettre l'exportation de l'hémolysine non repliée (Hagan *et al.*, 2009, Stanley *et al.*, 1998, Thanabalu *et al.*, 1998). Suite à l'exportation de HlyA, le complexe HlyB/HlyD se désengage de TolC et retourne à un état de repos (Hagan *et al.*, 2009). La sécrétion de l'hémolysine est un processus nécessitant l'énergie provenant de l'hydrolyse de l'ATP par HlyB, en effet, en absence d'ATP HlyA est piégé dans le cytoplasme, lié au complexe protéique HlyB/HlyD (Koronakis *et al.*, 1995, Thanabalu *et al.*, 1998).

La concentration de calcium dans le cytoplasme bactérien étant faible, inférieure à 100 nM, les répétitions RTX de l'hémolysine ne lieront du calcium qu'après sa sécrétion (Linhartova *et al.*, 2010). La liaison du calcium est essentielle puisqu'elle modifie et stabilise la structure tertiaire de la toxine (Sanchez-Magraner *et al.*, 2007, Schindel *et al.*, 2001). Ce changement de conformation fait émerger les régions hydrophobes de l'hémolysine à sa surface. Par conséquent, en présence de membranes lipidiques, la toxine s'y lie, et en absence de membranes, elle s'autoaggrège (Bakas *et al.*, 1998, Boehm *et al.*, 1990b, Dobereiner *et al.*, 1996, Rennie *et al.*, 1974, Soloaga *et al.*, 1998). La présence de calcium dans l'environnement de la bactérie est donc requise pour l'activité de l'hémolysine, et plus il y a de calcium, plus la toxine est active, et ce jusqu'à une concentration de 10 mM (Boehm *et al.*, 1990a, Short *et al.*, 1971). La modification de l'hémolysine par HlyC n'a pas d'effet sur la liaison du calcium, mais la délétion des répétitions RTX abolit cette possibilité (Boehm *et al.*, 1990b). La liaison du calcium est donc indispensable pour lier les membranes des cellules cibles, mais celle-ci n'influence pas la formation de pores par l'hémolysine (Dobereiner *et al.*, 1996).

Pour que l'hémolysine soit active, il faut donc qu'elle soit modifiée par HlyC, puis secrétée dans le milieu extracellulaire par le complexe protéique HlyB, HlyD et TolC et enfin, qu'elle lie des ions calcium au niveau de ses répétitions RTX.

3.5. Rôles

Le rôle de l'hémolysine dans les infections du tractus urinaire est assez difficile à comprendre. En effet, ce facteur de virulence, produit par un grand nombre d'*E. coli* pathogènes, ne semble pas avoir les mêmes effets selon le lieu de l'infection et la souche productrice (Hagan *et al.*, 2009, Ristow *et al.*, 2016). Par contre, la production d'hémolysine est associée à la cytotoxicité à l'encontre de tissus *in vitro*, mais aussi avec la présence de dommages étendus de l'urothélium chez la souris (Cooke *et al.*, 1975, Smith *et al.*, 2008).

Le champ d'action de l'hémolysine est très large, il comprend notamment des cellules urothéliales (Hagan *et al.*, 2009, Smith *et al.*, 2008), les cellules épithéliales rénales (Chen *et al.*, 2006, Uhlen *et al.*, 2000), mais aussi les cellules endothéliales (Suttorp *et al.*, 1990), les fibroblastes (Hagan *et al.*, 2009) et les érythrocytes (Hagan *et al.*, 2009, Short *et al.*, 1971). Elle possède également une spécificité pour les composants du système immunitaire, comme les granulocytes (Gadeberg *et al.*, 1983, Smith *et al.*, 2008) ou les monocytes (Bhakdi *et al.*, 1989, Bhakdi *et al.*, 1990, Gadeberg *et al.*, 1983). Son action a également été constatée sur des membranes et vésicules lipidiques synthétiques (Benz *et al.*, 1989, Menestrina *et al.*, 1987, Menestrina *et al.*, 1994, Ostolaza *et al.*, 1993).

La nature et l'existence de récepteurs pour l'hémolysine à la surface des cellules eucaryotes sont sujettes à débat. L'hémolysine semble pouvoir se lier à sa cible en présence ou non d'un récepteur. Elle peut par exemple lier des composés membranaires glycosylés comme les gangliosides ou des glycoprotéines, notamment la glycophorine, une protéine abondante à la surface des érythrocytes, via une région conservée chez les toxines RTX (Cortajarena *et al.*, 2001, Cortajarena *et al.*, 2003, Linhartova *et al.*, 2010). Elle est également capable de lier LFA-1, un membre de la famille des intégrines $\beta 2$, trouvé dans la plupart des leucocytes, et jouant un rôle essentiel lors de l'induction de la réponse inflammatoire de l'hôte (Lally *et al.*, 1997, Valeva *et al.*, 2005). Enfin, il a aussi été mis en évidence que l'hémolysine pouvait se lier à une membrane sans utiliser de récepteur, notamment par l'utilisation de bicouches lipidiques synthétiques (Benz *et al.*, 1989, Menestrina *et al.*, 1987, Menestrina *et al.*, 1994), mais aussi par l'absence de saturabilité de la liaison de la toxine sur des érythrocytes de lapin (Cortajarena *et al.*, 2001, Eberspacher *et al.*, 1989). La liaison de l'hémolysine peut donc être dépendante, ou non, de plusieurs récepteurs à la surface des cellules cibles. Enfin, il est utile de préciser que l'étape de liaison de l'hémolysine à la membrane de la cellule cible est dissociée de la lyse provoquée par la toxine (Bhakdi *et al.*, 1986).

3.5.1. Formation de pores

La caractéristique principale de l'hémolysine est la formation de pores dans les membranes plasmiques de ses cibles (Benz *et al.*, 1989, Bhakdi *et al.*, 1989, Bhakdi *et al.*, 1990, Boehm *et al.*, 1990a, Menestrina *et al.*, 1987, Ostolaza *et al.*, 1993, Thomas *et al.*, 2014). Le mécanisme d'insertion dans la membrane, ainsi que la formation de pores par les toxines RTX, reste assez peu compris. Aussi, la mort cellulaire induite par HlyA semble utiliser plusieurs voies cellulaires (Linhartova *et al.*, 2010, Thomas *et al.*, 2014). De plus, il n'existe pas de consensus quant au statut d'oligomérisation de la toxine lors de la formation de pores. Des monomères ont été extraits depuis les membranes cibles (Menestrina *et al.*, 1987), de plus d'autres groupes n'ont pas réussi à isoler et identifier des oligomères de HlyA (Moayeri *et al.*, 1997). Cependant, d'autres études montrent, via des courbes doses-réponse, que l'hémolysine agit comme un multimère (Benz *et al.*, 1992, Ostolaza *et al.*, 1993).

Comme discuté précédemment, les récepteurs membranaires ne sont pas obligatoires pour la liaison de l'hémolysine sur la membrane plasmique de sa cible, il semblerait qu'ils ne soient pas non plus requis pour la formation de pores. Cependant la composition de la membrane influence la cinétique (Menestrina *et al.*, 1987, Ostolaza *et al.*, 1993). Le processus de liaison avec la cellule et de perméabilisation membranaire est très rapide, il ne faut que quelques secondes à quelques minutes pour constater la formation de pores, notamment via la libération d'ATP (Bhakdi *et al.*, 1989, Bhakdi *et al.*, 1986, Menestrina *et al.*, 1987).

La formation du pore se fait en plusieurs étapes, suite à la liaison de l'hémolysine sur la membrane de sa cible, celle-ci s'adsorbe, de façon réversible, indépendamment de la composition et de la fluidité de la membrane. Ensuite, la toxine s'insère dans la membrane, de façon irréversible et en tenant compte de ses propriétés physiques. Lorsque la toxine est liée de façon irréversible à la membrane, la fluorescence des résidus tryptophane montre qu'ils sont dans un environnement moins polaire que lorsqu'ils sont libres en solution, confirmant que la toxine est insérée dans la bicouche lipidique (Bakas *et al.*, 1996). La région hydrophobe de la partie N-terminale semble responsable de l'insertion de la toxine dans la membrane (Hyland *et al.*, 2001, Schindel *et al.*, 2001).

Le pore formé par l'hémolysine a une durée de vie limitée, mais celui-ci semble quand même augmenter au cours du temps (Benz *et al.*, 1989, Moayeri *et al.*, 1997). Sa taille dépend de la concentration de la toxine, du temps de contact de celle-ci avec sa cible, mais aussi de la température (Eberspacher *et al.*, 1989, Moayeri *et al.*, 1997). Le pore étant sélectif pour les cations, il cause un influx d'ions calcium dans la cellule (Benz *et al.*, 1992, Bhakdi *et al.*, 1989, Boehm *et al.*, 1990a, Menestrina *et al.*, 1987, Thomas *et al.*, 2014).

3.5.2. Concentrations sublytiques

Observer les effets de l'hémolysine à de faibles concentrations permet d'observer des activités discrètes de l'hémolysine. En effet, elle est capable de moduler la fonctionnalité et la viabilité de cellules cibles et peut déclencher des événements cellulaires généralement liés à l'activation de récepteurs (Dhakal *et al.*, 2012, Valeva *et al.*, 2005). La toxine agit notamment en déclenchant des voies de signalisation conduisant à une mort cellulaire discrète, pouvant être confondue avec l'exfoliation (Ristow *et al.*, 2016). Ou encore, elle peut moduler les voies inflammatoires via des cascades protéolytiques, permettant ainsi au pathogène de gagner du temps dans l'établissement de l'infection (Dhakal *et al.*, 2012, Wiles *et al.*, 2008a).

L'insertion de l'hémolysine dans la membrane d'une cellule cible, puis la formation d'un pore crée une perturbation membranaire, résultant en l'augmentation non régulée du flux de cations (Cavalieri *et al.*, 1982, Keane *et al.*, 1987). En premier lieu, les ions potassium, K⁺, sortent en grand nombre de la cellule causant l'activation de la voie p38-MAPK, pouvant conduire à l'apoptose ou induire la production de cytokines pro-inflammatoires (Kloft *et al.*, 2009).

Le flux de cations le plus étudié dans le cas de l'hémolysine est celui de l'entrée massive d'ions calcium. La perturbation des niveaux de calcium dans la cellule hôte est un mécanisme communément utilisé par les pathogènes pour manipuler les propriétés cellulaires, pouvant conduire à la réorganisation du cytosquelette ou à la mort cellulaire. En effet, le calcium est un important messager cellulaire qui peut contrôler l'expression de gènes et la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires (TranVan Nhieu *et al.*, 2004). L'insertion de l'hémolysine, puis la formation d'un pore dans la membrane plasmique de ses cibles, n'induit pas seulement une augmentation de la concentration de calcium intracellulaire, mais aussi une oscillation de cette même concentration, dépendante de l'activation de la GTPase RhoA, pouvant conduire à la production des interleukines IL-1 β , IL-6 ou encore IL-8 (Bhakdi *et al.*, 1990, Grimminger *et al.*, 1991, Hagan *et al.*, 2009, Mansson *et al.*, 2007a, Ristow *et al.*, 2016, Uhlen *et al.*, 2000, Welch, 1991). L'interleukine 1 β , IL-1 β , a pour rôle d'induire la sécrétion d'autres cytokines donc de stimuler la réponse inflammatoire. L'interleukine 6, IL-6, est une cytokine pro-inflammatoire sécrétée par un grand nombre de cellules qui induit notamment la maturation des lymphocytes et la sécrétion d'immunoglobulines. Enfin, l'interleukine 8, IL-8, est également une cytokine pro-inflammatoire qui agit comme un chimioattractant pour différentes cellules du système immunitaire (Borish *et al.*, 2003, Kaufmann *et al.*, 2011, O'Gorman *et al.*, 2008).

L'hémolysine déclenche également l'activation de sérines protéases qui dégradent la paxilline, une protéine du cytosquelette associée aux adhésions focales (Dhakal *et al.*, 2012). Elle est également responsable de la déphosphorylation d'Akt, un régulateur clé des voies de signalisation inflammatoire via NF κ B et de survie cellulaire (Wiles *et al.*, 2008a). Aussi, la toxine active les récepteurs P2X, permettant un flux de cations à travers la membrane, et active les canaux pannexine permettant les échanges d'ions entre cellules ou encore la sécrétion de molécules de signalisation dans le milieu extracellulaire (Browne *et al.*, 2014, Penuela *et al.*, 2013, Skals *et al.*, 2009). La toxine peut également induire une augmentation de la production de métabolites réactifs à l'oxygène ainsi qu'une forte déplétion de l'ATP cellulaire (Bhakdi *et al.*, 1990, Keane *et al.*, 1987).

De faibles doses d'hémolysine peuvent donc induire la dégradation de composants régulatoires et structurels du cytosquelette, mais aussi des voies de réponse inflammatoire, ceci pour promouvoir l'exfoliation des cellules, mais aussi pour ralentir la réponse inflammatoire de l'hôte (Dhakal *et al.*, 2012). Enfin, il faut savoir que toutes ses réactions ne sont observées que sur une plage étroite de concentration de la toxine, des doses plus élevées tuent rapidement les cellules cibles, comme décrit dans la prochaine section (Valeva *et al.*, 2005).

3.5.3. Concentrations lytiques

De plus fortes concentrations d'hémolysine induisent non seulement la formation de pores, mais aussi la mort cellulaire via apoptose, nécrose ou lyse (Chen *et al.*, 2006, Hagan *et al.*, 2009, Keane *et al.*, 1987, Ristow *et al.*, 2016, Welch, 2001). Le processus de mort cellulaire dépend de la cellule ciblée, de la concentration de toxine et du temps d'exposition (Welch, 2001). L'hémolysine active les caspases 1 et 4, qui à leur tour activent les voies inflammatoires de la cellule, mais aussi les caspases pro-apoptotiques 3 et 7 (Nagamatsu *et al.*, 2015, Russo *et al.*, 2005). Dans le cas des infections du tractus urinaire, l'hémolysine peut ainsi créer des brèches dans les barrières épithéliales de la vessie et des reins permettant aux pathogènes d'accéder aux tissus plus profonds voire à la circulation sanguine (Chen *et al.*, 2006, Hagan *et al.*, 2009, Mansson *et al.*, 2007b, Ristow *et al.*, 2016).

En présence d'un fort ratio hémolysine / cellules, la majorité des cellules sont immédiatement affectées par la toxine, observable notamment par des perturbations biochimiques causant des dommages cellulaires (Cavaliere *et al.*, 1982, Keane *et al.*, 1987, Suttorp *et al.*, 1990).

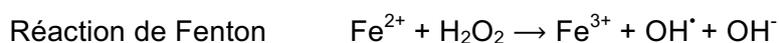
Les cellules hôtes recevant de hautes doses d'hémolysine subissent la formation de pores dans leur membrane, des fluctuations ioniques, causées par un influx d'eau et de cations, mais aussi la perte de la pression osmotique, un rétrécissement cellulaire suivi d'une augmentation graduelle de volume, ces phénomènes conduisant à la lyse cellulaire (Bhakdi *et al.*, 1986, Menestrina *et al.*, 1987, Ristow *et al.*, 2016, Skals *et al.*, 2009, Suttorp *et al.*, 1990). L'ATP libérée lors de la formation de pores amplifie le processus hémolytique (Skals *et al.*, 2009). Cependant, il faut considérer qu'il est peu probable que ces niveaux élevés de toxine soient réellement atteints *in vitro*, même si la mort cellulaire n'est pas immédiate, la viabilité cellulaire décroît progressivement dans les heures suivant l'intoxication par l'hémolysine à de plus faibles doses (Keane *et al.*, 1987, Uhlen *et al.*, 2000).

4. Homéostasie du fer

Le fer est un nutriment essentiel pour presque toutes les bactéries, et les êtres vivants en général. C'est également le 4^e métal le plus abondant de la croûte terrestre (Andrews *et al.*, 2003, Koster, 2001, Litwin *et al.*, 1993). Ce métal de transition est présent sous deux formes, dépendamment des conditions physiologiques, la forme réduite appelée ferrique, Fe²⁺, et la forme oxydée dite ferreuse, Fe³⁺ (Andrews *et al.*, 2003). Le potentiel redox du fer varie entre 1 300 mV et 2 500 mV, ce qui explique sa participation dans une grande variété de réactions de transfert d'électrons, ainsi que son incorporation dans les protéines dès les premiers stades de vie (Andrews *et al.*, 2003, Koster, 2001).

Dans l'environnement, c'est un composant des hydroxydes insolubles, dans les systèmes biologiques, il est chélaté par des protéines ayant une haute affinité pour le fer comme les transferrines, les lactoferrines ou les ferritines, ou bien il fait partie des composants des érythrocytes, comme l'hème, l'hémoglobine ou encore l'hémopexine (Koster, 2001, Porcheron *et al.*, 2015). Le fer participe à de nombreux processus biologiques majeurs comme la photosynthèse, la respiration cellulaire, le transport et le stockage de l'oxygène, la régulation des gènes, la biosynthèse de l'ADN et il est également catalyseur dans le processus de transport d'électrons (Andrews *et al.*, 2003, Litwin *et al.*, 1993, Porcheron *et al.*, 2015). Sa fonction biologique dépend presque entièrement de son insertion dans les protéines et dans des enzymes ayant des rôles cellulaires importants, notamment les cytochromes, les réductases des ribonucléotides, les nitrogénases, les peroxydases, les catalases, la succinate déshydrogénase et d'autres protéines qui sont liées aux divers processus décrits précédemment (Andrews *et al.*, 2003, Koster, 2001, Litwin *et al.*, 1993).

Lorsque les organismes pratiquant la photosynthèse ont commencé à rejeter de l'oxygène dans l'atmosphère, le fer ferrique, insoluble, est devenu plus présent que le fer ferreux, soluble, ce qui a eu pour conséquence d'en réduire la disponibilité pour les organismes (Andrews *et al.*, 2003). Par ailleurs, en conditions aérobiques, l'oxygène et le fer sont à l'origine de radicaux libres, via la réaction de Fenton, présentée ci-dessous, qui peuvent générer du stress oxydatif et endommager des acides nucléiques, protéines et membranes cellulaires (Andrews *et al.*, 2003, Masse *et al.*, 2005, Porcheron *et al.*, 2015, Porcheron *et al.*, 2013, Touati, 2000).



Les besoins en fer des organismes se situent entre 10^{-7} M et 10^{-5} M, or la solubilité du fer ferrique n'est que de 10^{-17} M. C'est pourquoi les organismes ont développé des stratégies pour la gestion du fer, notamment son transport avec une forte affinité, son entreposage, des systèmes de résistance au stress oxydatif, la régulation de l'expression des protéines utilisant le fer ainsi que des systèmes de régulation globale pour contrôler le niveau de fer intracellulaire (Andrews *et al.*, 2003). Les organismes ont aussi développé des systèmes de régulation stricte de leur consommation et de leur acquisition en fer, afin de maintenir une concentration intracellulaire non dommageable à la cellule, mais suffisante pour son bon fonctionnement, c'est l'homéostasie du fer (Andrews *et al.*, 2003, Porcheron *et al.*, 2015).

Ces systèmes d'homéostasie répondent à la disponibilité du fer via des régulateurs qui modifient l'expression des gènes, permettant ainsi la survie bactérienne (Porcheron *et al.*, 2015). À cause de l'importance biologique du fer, de nombreux systèmes d'acquisition du fer et de l'hème sont impliqués dans la pathogénèse bactérienne (Koster, 2001, Litwin *et al.*, 1993, Porcheron *et al.*, 2015). En effet, durant une infection la disponibilité en fer est limitée par l'hôte qui induit une anémie, appelée l'immunité nutritionnelle, en réponse à une infection aiguë et empêche le pathogène d'acquérir le fer qui lui est nécessaire. Cette limitation est notamment induite par l'augmentation de la séquestration du fer par la transferrine dans le sang, ainsi que par la ferritine dans les cellules, et la diminution de la saturation en fer dans le sérum via l'haptoglobine qui lie le fer libre (Litwin *et al.*, 1993, Porcheron *et al.*, 2013). Cependant, le changement d'un environnement riche en fer à un environnement limité en fer est un signal environnemental d'induction des gènes de virulence pour les bactéries pathogènes (Litwin *et al.*, 1993). Chez *Escherichia coli*, les systèmes d'acquisition et de stockage du fer sont majoritairement contrôlés par les régulateurs Fur et RyhB (Porcheron *et al.*, 2015).

4.1. Acquisition du fer par les bactéries pathogènes

Une cellule bactérienne contient environ 10^5 à 10^6 ions fer qui sont essentiels à de nombreuses voies métaboliques. Cependant, la faible solubilité du Fe^{3+} à un pH physiologique, et en présence d'oxygène, constitue un véritable frein à son acquisition. De plus, les microorganismes colonisant l'humain sont confrontés à un autre problème, 99,9 % du fer total de leur hôte, environ 4 g, est intracellulaire ou lié à des protéines liant le fer, il est donc peu accessible (Wandersman *et al.*, 2000).

Le fer est maintenu dans un état soluble en étant lié à des molécules porteuses comme l'hémoglobine, l'hème, la ferritine, la transferrine et la lactoferrine ou bien en étant réduit à l'état de fer ferrique (Litwin *et al.*, 1993). L'hémoglobine et l'hème constituent la source de fer de nombreuses bactéries, mais celles-ci sont rapidement liées par des protéines du sérum, l'haptoglobine ou l'hémopexine et donc moins facilement accessibles (Litwin *et al.*, 1993, Porcheron *et al.*, 2015). C'est pourquoi les bactéries pathogènes qui peuvent coloniser efficacement leur hôte humain sont capables d'assimiler le fer depuis des sources variées (Litwin *et al.*, 1993, Wandersman *et al.*, 2000).

Les molécules contenant du fer ne sont pas transportées à travers la membrane externe des bactéries Gram-négatives par diffusion passive, étant donné les faibles concentrations extracellulaires, 10^{-18} M dans le sérum humain, et leur taille relativement importante (Litwin *et al.*, 1993, Wandersman *et al.*, 2000). Ces molécules sont reconnues et liées par des récepteurs spécifiques, dépendants de l'ATP ou du GTP, présents à la surface de la bactérie puis transportées contre un gradient de concentration dans le périplasme. Il existe deux systèmes de capture du fer, le premier reconnaissant directement les protéines liant le fer, le deuxième consistant en la sécrétion de sidérophores (Wandersman *et al.*, 2000).

Les bactéries pathogènes ont développé des systèmes d'acquisition directe du fer, notamment des réductases qui permettent de récupérer le fer depuis la transferrine, le citrate utilisé comme transporteur du fer de faible affinité, des hémolysines qui libèrent le fer lié à l'hème ou l'hémoglobine intracellulaire (Litwin *et al.*, 1993).

4.1.1. Capture de l'hème

L'hème est la source de fer la plus abondante chez l'hôte pour les bactéries (Porcheron *et al.*, 2013). Les systèmes d'acquisition de l'hème sont également répartis en deux catégories. Le premier implique une liaison directe de l'hème ou d'une protéine contenant un hème à des récepteurs spécifiques sur la surface de la bactérie. Le deuxième implique une sécrétion d'hémophores, des hémoprotéines qui lient l'hème extracellulaire puis le présenter à un récepteur spécifique (Porcheron *et al.*, 2013, Wandersman *et al.*, 2000).

L'hème seul est lié par des récepteurs spécifiques de la membrane externe, transporté dans le périplasme puis à travers la membrane interne via des perméases périplasmiques dépendantes de protéines ABC. Par contre, les protéines contenant l'hème seront déchargées de celui-ci à la surface de la bactérie, puis l'hème sera transporté de la même façon que précédemment vers le cytoplasme (Wandersman *et al.*, 2000).

Cependant, lorsque l'hème n'est pas disponible de façon libre en circulation, les bactéries peuvent sécréter des toxines comme l'hémolysine, mais aussi des protéases ou d'autres cytolysines, qui libèrent l'hème et en permettent l'acquisition directe. Aussi, certains autotransporteurs de la famille des SPATES sont capables de dégrader l'hémoglobine, également pour libérer l'hème (Porcheron *et al.*, 2013).

Les hémophores forment une famille indépendante de protéines liant l'hème, sans aucune homologie avec d'autres protéines connues (Wandersman *et al.*, 2000). Elles sont sécrétées via un système de sécrétion de type 1 grâce à leur signal de sécrétion C-terminal et possèdent une plus haute affinité pour l'hème que les protéines de l'hôte, telles que l'hémopexine ou la myoglobine. Une fois dans le milieu extracellulaire, elles lient l'hème depuis les protéines de l'hôte, sans préférence pour l'état d'oxydation du fer, et l'amènent à un récepteur spécifique de la membrane externe de la bactérie (Porcheron *et al.*, 2013, Wandersman *et al.*, 2000).

Il faut savoir que seul le récepteur est essentiel à l'acquisition de l'hème, l'hémophore n'est pas essentiel, mais permet d'augmenter 100 fois l'efficacité du système de capture de l'hème, qu'il soit libre ou lié à l'hémoglobine. Cependant l'hémophore peut extraire l'hème depuis d'autres sources comme l'hémopexine ou la myoglobine, permettant d'élargir le spectre des sources potentielles d'hème pour la bactérie (Wandersman *et al.*, 2000).

L'hème et les hémoprotéines lient des récepteurs, dépendants de TonB, spécifiques à la surface de la bactérie pour permettre à l'hème de traverser la membrane externe. Dans le cas des hémophores, leur hème est extrait, les hémophores sont donc recyclés dans le milieu extracellulaire et l'hème transporté vers le périplasme, puis vers le cytoplasme via des transporteurs ABC, où des oxygénases le dégraderont ensuite pour extraire le fer. Chez les UPEC, le système Shu et le récepteur Hma ont été identifiés pour ces fonctions (Porcheron *et al.*, 2013).

La redondance partielle de ces systèmes d'acquisition de l'hème chez les bactéries Gram-négatives est la conséquence de la diversité des sources potentielles d'hème dans leur environnement ainsi que de la variété d'hémoprotéines rencontrées dans les différents stades et sites d'infection (Wandersman *et al.*, 2000).

4.1.2. Utilisation des sidérophores

Les sidérophores sont des petites molécules de faible poids moléculaire sécrétées par la bactérie (Andrews *et al.*, 2003, Porcheron *et al.*, 2013, Winkelmann, 2002). Ils sont capables de solubiliser le fer depuis des complexes minéraux dans l'environnement, mais surtout de rivaliser avec la transferrine et la lactoferrine pour lier le fer (Litwin *et al.*, 1993, Porcheron *et al.*, 2013, Winkelmann, 2002). Les sidérophores sont synthétisés dans le cytoplasme et requièrent un système spécifique d'exportation pour rejoindre le milieu extracellulaire (Porcheron *et al.*, 2013, Winkelmann, 2002). Ce système d'exportation implique une protéine liée à la membrane interne et une protéine canal, TolC (Porcheron *et al.*, 2013).

Presque toutes les souches d'*Escherichia coli* produisent l'entérobactine. Celle-ci est internalisée grâce au récepteur FepA, le transporteur ABC FepCDG et la chaperonne FepB. Certaines souches pathogènes produisent d'autres sidérophores qui leur sont spécifiques comme la salmochéline, l'aérobactine ou la yersiniabactine. La salmochéline est une forme glycosylée de l'entérobactine, elle est internalisée via le récepteur IroN et utilise le même transporteur que cette dernière, FepCDG. L'aérobactine est internalisée via le récepteur IutA et le transporteur ABC FhuBC. Enfin, la yersiniabactine est internalisée via le récepteur Psn/FyuA et le transporteur ABC YbtPQ. Le type de sidérophore produit dépend du pathotype de la souche. En plus des sidérophores qu'elles synthétisent et sécrètent, les souches pathogènes sont aussi capables d'internaliser des sidérophores exogènes comme le ferrichrome, d'origine fongique, qui est internalisé via FhuABCD (Porcheron *et al.*, 2013).

Une fois dans le périplasme, le fer ferrique est directement réduit à l'état ferreux par des réductases, ceci permettant de libérer le fer qui sera transféré à des protéines, le sidérophore sera quant à lui recyclé dans l'espace extracellulaire (Porcheron *et al.*, 2013). Dans le cas où le potentiel redox du complexe ferri-sidérophore est trop haut, des estérases spécifiques dégradent le sidérophore puis des réductases libèrent le fer (Porcheron *et al.*, 2013, Winkelmann, 2002).

La répétition des systèmes d'acquisition du fer via les sidérophores montre la nécessité de l'adaptation du pathogène à différentes niches limitées en fer où il devra entrer en compétition avec d'autres microorganismes ou avec l'hôte pour l'acquisition du fer (Porcheron *et al.*, 2013).

4.2. Régulation par Fur

Le régulateur transcriptionnel Fur, codé par le gène du même nom, est une protéine de 148 acides aminés, 17 kDa, active sous la forme d'un dimère (Bagg *et al.*, 1987, Litwin *et al.*, 1993). Fur possède deux domaines importants, le domaine C-terminal qui contient les sites de liaison de métaux et de dimérisation et le domaine N-terminal qui est important pour la liaison à l'ADN (Hantke, 2001).

Il s'agit du régulateur principal de l'homéostasie du fer chez la bactérie qui détecte les niveaux de fer intracellulaires et ajuste l'expression d'au moins 90 gènes (Hantke, 2001, Porcheron *et al.*, 2013). Environ 60 de ces gènes sont liés à l'homéostasie du fer, codant pour la synthèse et le transport des sidérophores (Hantke, 2001, Masse *et al.*, 2002, Masse *et al.*, 2005, Porcheron *et al.*, 2013). Les autres gènes régulés par Fur ont un rôle dans la gestion du stress oxydatif, la résistance acide et la régulation des gènes de virulence (Hantke, 2001, Porcheron *et al.*, 2013). Pour effectuer son activité de répression, Fur a besoin d'un co-régulateur, à savoir le Fe^{2+} (Bagg *et al.*, 1987, Litwin *et al.*, 1993).

Les sites de liaison de Fur sont des séquences homologues. Un consensus a été établi pour une région de 19 pb chevauchant le promoteur des gènes régulés, appelée « Fur Box », présentée en figure 10 ci-dessous (Baichoo *et al.*, 2002, Calderwood *et al.*, 1987, de Lorenzo *et al.*, 1987, Litwin *et al.*, 1993). Ce site se retrouve également dans le promoteur du gène *fur* lui-même, montrant qu'il est autorégulé, mais il est aussi régulé par la réponse au stress oxydatif via SoxRS et OxyR (Calderwood *et al.*, 1987, Hantke, 2001).

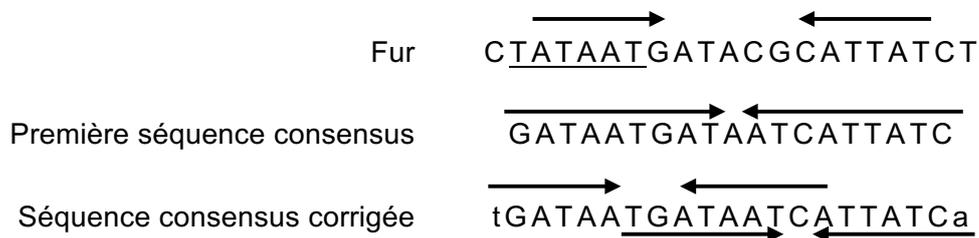


Figure 10. Séquences consensus pour le régulateur Fur : "Fur Box". La première ligne montre la présence de la séquence consensus dans le promoteur du gène *fur* qui est donc autorégulé. La deuxième ligne montre la séquence consensus proposée par Calderwood *et al.* (1987). La dernière ligne montre la séquence consensus revue par Baichoo *et al.* (2002). Les nucléotides soulignés indiquent la présence d'une boîte -10, les flèches indiquent les séquences inversées répétées. Adapté et modifié depuis (Baichoo *et al.*, 2002, Calderwood *et al.*, 1987, de Lorenzo *et al.*, 1987, Litwin *et al.*, 1993).

Comme le montre la figure 11 ci-dessous, en présence de fer, le complexe fer-Fur lie avec une forte affinité ses sites de liaison sur l'ADN, empêchant la transcription des gènes en aval (Litwin *et al.*, 1993, Masse *et al.*, 2005, Porcheron *et al.*, 2013). Lorsque la concentration de fer intracellulaire chute, Fur est inactif, il perd son affinité pour l'ADN, et la répression des gènes est levée (Masse *et al.*, 2002, Masse *et al.*, 2005, Porcheron *et al.*, 2013). Dans le cadre des infections du tractus urinaire, Fur est un régulateur négatif de la virulence des UPEC quand celles-ci sont en présence d'une quantité suffisante de fer pour leur croissance. Cependant leur virulence est déréprimée lorsque les concentrations de fer deviennent limitées. En effet, il réprime l'attachement des bactéries sur les cellules hôtes ainsi que le développement des communautés bactériennes intracellulaires (Kurabayashi *et al.*, 2016).

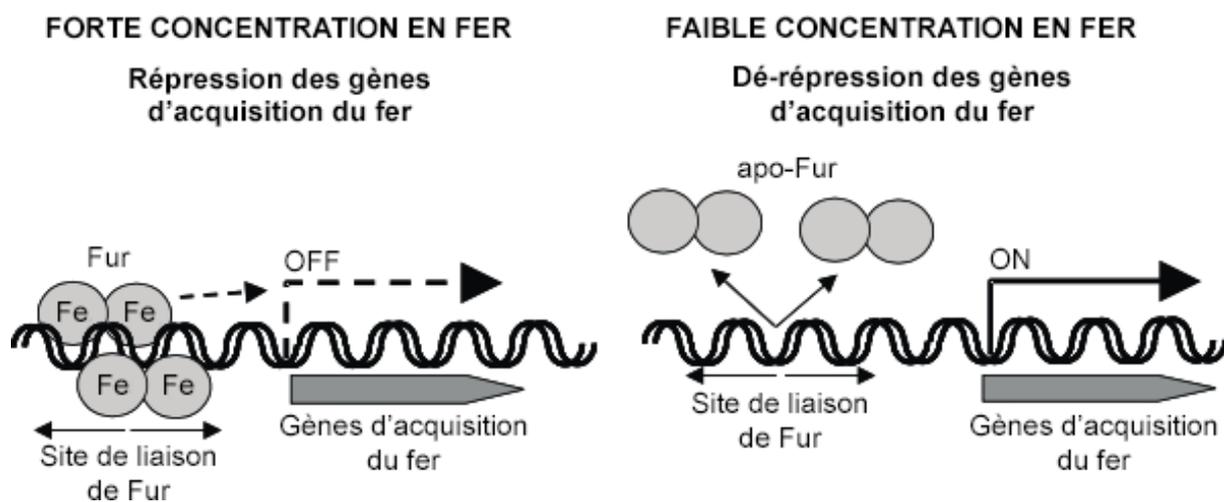


Figure 11. Mécanisme de répression par Fur. Lorsque la bactérie est en présence d'une forte concentration de fer, celui-ci se lie à Fur permettant sa dimérisation et sa liaison à l'ADN sur la « Fur Box », ce qui empêche la transcription des gènes d'acquisition du fer. Au contraire, lorsque la bactérie est en présence d'une faible concentration de fer, le fer ne lie plus Fur qui ne peut plus lier la « Fur Box » sur l'ADN, permettant donc la transcription des gènes d'acquisition du fer. Adapté de (Andrews *et al.*, 2003).

Les souches mutantes, où le gène *fur* est supprimé, ne sont pas capables de croître avec une source de carbone non fermentable comme l'acétate, le succinate ou le fumarate (Litwin *et al.*, 1993). Elles produisent également plus de sidérophores et expriment tous les systèmes d'acquisition du fer de façon constitutive, mais sa concentration intracellulaire restera faible (Litwin *et al.*, 1993, Masse *et al.*, 2002, Porcheron *et al.*, 2014). Ces souches sont également plus sensibles au stress oxydatif. Cependant, la colonisation d'un mutant Fur n'est pas atténuée dans le modèle murin (Porcheron *et al.*, 2014).

4.3. Régulation par RyhB

Certains gènes régulés par Fur sont surexprimés en conditions riches en fer, ils ne présentent pas de site de liaison à Fur et semblent régulés suite à leur transcription (Hantke, 2001, Porcheron *et al.*, 2013). Ceci est possible grâce à RyhB, un petit ARN non codant, ou sRNA, de 90 nucléotides dont la structure secondaire est montrée en figure 12 ci-dessous. Sa séquence codante, ainsi que le promoteur en amont sont très conservés chez *Escherichia coli*, *Salmonella* et aussi *Klebsiella* (Masse *et al.*, 2002, Masse *et al.*, 2007, Porcheron *et al.*, 2013). Tous les mécanismes de régulation par RyhB, commencent avec l'appariement antisens de ce dernier sur l'ARNm cible du gène à réguler (Masse *et al.*, 2007, Porcheron *et al.*, 2015, Porcheron *et al.*, 2013, Salvail *et al.*, 2012). Il en affecte positivement ou négativement la traduction et la stabilité (Porcheron *et al.*, 2015, Porcheron *et al.*, 2013).

Pour son activité, RyhB a besoin de la chaperonne Hfq, en effet en son absence, RyhB est dégradé par la RNase E (Masse *et al.*, 2003, Masse *et al.*, 2002). Cette chaperonne est indispensable à la stabilité, mais aussi à la liaison de RyhB sur sa cible (Geissmann *et al.*, 2004).

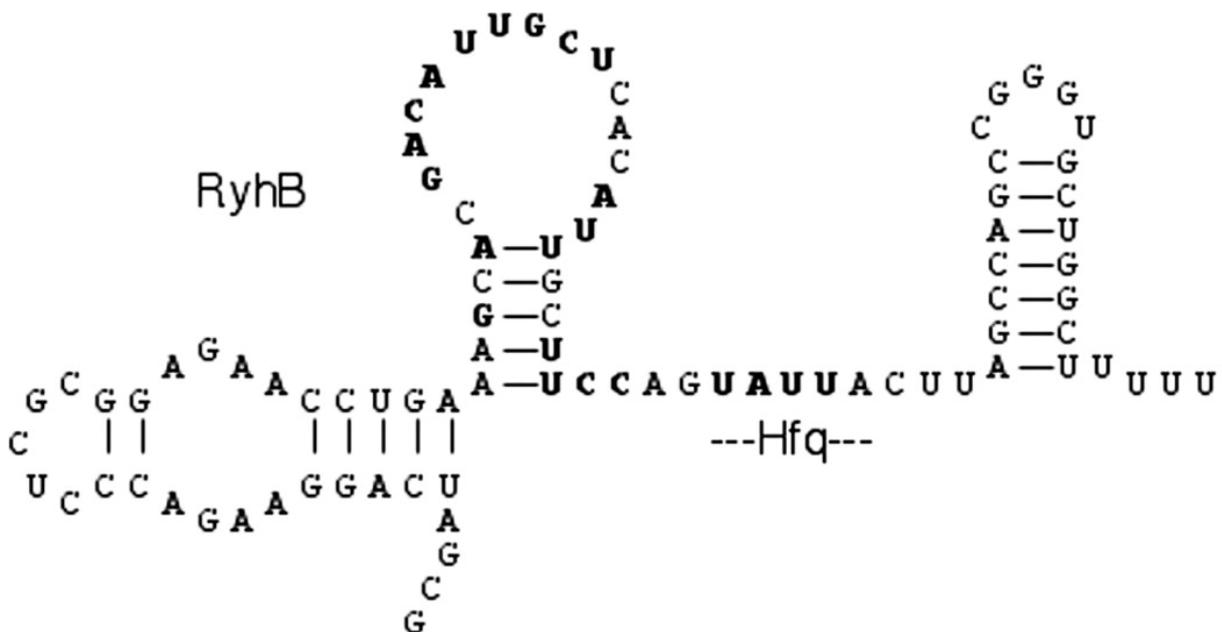


Figure 12. Structure secondaire de RyhB. Le site de liaison de la chaperonne Hfq est indiqué. (Tjaden *et al.*, 2006).

RyhB est lui-même régulé par la concentration en fer via Fur, son expression est réprimée par Fur en conditions riches en fer, et induite lorsque Fur est inactivé par le manque de fer dans l'environnement (Masse *et al.*, 2002, Porcheron *et al.*, 2013). En effet, la quantité de RyhB est augmentée chez un mutant *fur*, et l'ajout de chélateur de fer, le dipyridyl par exemple, induit également l'expression du sRNA (Masse *et al.*, 2002).

Lors d'une régulation négative, la liaison de RyhB se fait à proximité de la région d'initiation de la traduction (Salvail *et al.*, 2012). Cet appariement permet à RyhB d'entrer en compétition directe avec la liaison des ribosomes ce qui inhibe la traduction de l'ARNm (Geissmann *et al.*, 2004, Salvail *et al.*, 2010). Généralement, la liaison de RyhB sur sa cible induit le recrutement de la RNase E qui dégrade les deux ARN (Masse *et al.*, 2003, Masse *et al.*, 2005, Porcheron *et al.*, 2015). Cette co-dégradation permet de stopper rapidement l'action de RyhB une fois l'homéostasie du fer rétablie (Masse *et al.*, 2007). Si la dégradation n'a pas lieu, la simple liaison de RyhB est suffisante pour réprimer la traduction de l'ARNm ciblé (Masse *et al.*, 2007, Salvail *et al.*, 2012).

RyhB réprime au moins 18 transcrits, codants pour 56 protéines dont la plupart sont impliquées dans le métabolisme du fer (Masse *et al.*, 2007). Ces cibles incluent des protéines non essentielles utilisant du fer comme la succinate déshydrogénase, la superoxyde dismutase, certaines protéines de stockage du fer comme la ferritine ou la bactérioferritine, ou encore des gènes impliqués dans le métabolisme du fer (Masse *et al.*, 2005, Porcheron *et al.*, 2015, Porcheron *et al.*, 2013). Son rôle est donc de réduire la séquestration du fer par des protéines non essentielles, augmentant ainsi sa disponibilité pour les protéines essentielles (Jacques *et al.*, 2006, Masse *et al.*, 2007, Masse *et al.*, 2005, Salvail *et al.*, 2010). Cette augmentation n'est pas due à la libération de fer depuis des protéines non essentielles, mais bien à la dégradation des ARNm de ses protéines, permettant au fer nouvellement acquis de ne lier que les protéines essentielles, qui ne sont pas ciblées par RyhB (Jacques *et al.*, 2006). Une forte expression de RyhB induit une élimination complète de son ARNm cible en seulement 3 minutes (Masse *et al.*, 2003).

RyhB peut également induire la traduction de certains gènes. En effet, en conditions riches en fer, la chaperonne Hfq lie la région 5'-UTR de l'ARNm ciblé, formant une structure inhibitrice qui séquestre la région d'initiation de la traduction. Lorsque la concentration en fer chute, RyhB s'apparie à son tour sur l'ARNm et perturbe la structure inhibitrice, libérant ainsi la région d'initiation de la traduction pour les ribosomes et améliorant la stabilité de l'ARNm. Jusqu'à aujourd'hui, ce mécanisme n'a été confirmé que pour le gène *shiA*, qui code pour la perméase du même nom, essentielle à l'acquisition de shikimate, impliqué dans la synthèse des sidérophores (Prevost *et al.*, 2007, Salvail *et al.*, 2012).

RyhB médie l'acquisition du fer via la régulation de l'expression des gènes codants pour les sidérophores, notamment l'entérobactine, via le gène *entB*, et la salmochéline (Porcheron *et al.*, 2014). En effet, le manque de fer induit l'expression de RyhB, qui à son tour stabilise les ARNm des composés nécessaires à la biosynthèse des sidérophores (Prevost *et al.*, 2007). Les souches *ryhB* négatives produisant moins de sidérophores, sa présence est donc requise pour la bonne acquisition du fer. C'est pourquoi RyhB a un rôle important dans la pathogenèse de CFT073 *in vivo*, notamment à cause de ses effets sur la production des sidérophores (Porcheron *et al.*, 2014).

4.4. Fonctionnement commun

En conditions riches en fer, le complexe Fur-Fe²⁺ est actif et réprime la transcription de RyhB, mais aussi de gènes responsables de l'acquisition du fer en liant sa séquence spécifique dans la région promotrice des gènes ciblés (Porcheron *et al.*, 2015, Porcheron *et al.*, 2014). Lorsque la concentration en fer chute, Fur est inactif, la transcription de RyhB est induite et il réprime la synthèse des protéines liant le fer pour en restaurer l'homéostasie (Andrews *et al.*, 2003, Masse *et al.*, 2002, Salvail *et al.*, 2010). C'est grâce à ce mécanisme que Fur régule de façon indirecte, via RyhB, le stockage, l'utilisation et l'acquisition de fer dans la bactérie (Masse *et al.*, 2002). Ces deux mécanismes sont synthétisés dans la figure 13 ci-dessous.

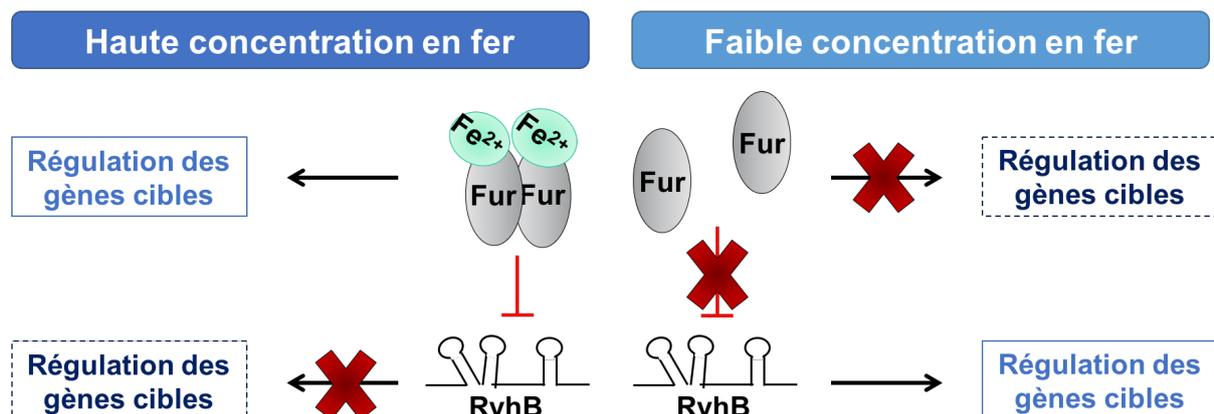


Figure 13. Régulation de Fur et RyhB. Dans un environnement riche en fer, la protéine Fur active réprime de nombreux gènes ainsi que RyhB, résultant dans la dérégulation des gènes cibles spécifiques à RyhB. En conditions pauvres en fer, la répression par Fur est levée et *ryhB* est exprimé, conduisant à la régulation, activation ou répression, des gènes cibles spécifiques à RyhB. Adapté de Porcheron *et al.* (2015).

PROBLEMATIQUE

Les infections du tractus urinaire, telles que la cystite ou la pyélonéphrite, sont les infections bactériennes les plus répandues dans les pays industrialisés, notamment par les *Escherichia coli* uropathogènes, ou UPEC, responsables dans 80 % à 85 % des cas. Malheureusement, bien qu'il existe aujourd'hui de nombreux traitements antibactériens efficaces, on dénombre encore 25 % des femmes souffrant d'épisodes d'infections récurrentes dans les six mois suivant la première infection. Cette dernière observation est d'autant plus grave que l'émergence de souches résistantes aux traitements antibiotiques classiques ainsi que la récurrence dans les infections du tractus urinaire posant le problème des effets des antibiotiques sur le long terme. Dans le laboratoire, l'hypothèse est faite que ces phénomènes pourraient être contrecarrés en atténuant la virulence des bactéries pathogènes. Ainsi, il est important de mieux comprendre les mécanismes de contrôle et de régulation régissant les facteurs de virulence de ces bactéries. Cette étude vise à améliorer la compréhension de la régulation de l'hémolysine chez les UPEC par Fur et RyhB dans le but de confirmer leur statut de cible thérapeutique pour limiter l'utilisation d'antibiotiques.

Le fer n'est pas seulement un métal essentiel aux fonctions biologiques des microorganismes, il s'agit également d'un signal environnemental, mais aussi d'un élément régulateur permettant aux bactéries de répondre rapidement, et efficacement, au manque de fer rencontré lors de la colonisation d'un hôte. En effet, une bactérie améliore sa survie, sa réplication et sa capacité à causer des maladies en répondant à la disponibilité en fer (Porcheron *et al.*, 2015). Dans le cas de bactéries pathogènes, un environnement pauvre en fer induit l'expression des facteurs de virulence. C'est pourquoi cibler des régulateurs transcriptionnels comme Fur ou traductionnels comme RyhB, permet de cibler, et déréguler, de nombreux facteurs de virulence. Ces deux régulateurs sont aujourd'hui considérés comme des cibles thérapeutiques potentielles dans le combat contre les pathogènes (Porcheron *et al.*, 2015).

Aussi, lors d'une capture large des cibles de RyhB, régulateur important de l'homéostasie du fer chez *Escherichia coli*, via la technique "MAPS", HlyA a été identifiée comme une cible potentielle, indiquant une régulation directe possible (Porcheron, résultats non publiés). Comme montré en figure 14, cette technique consistait en l'expression de RyhB marqué de l'aptamère MS2 dans CFT073. Les bactéries étaient ensuite lysées, puis les lysats étaient passés dans des colonnes où la protéine MS2 avait été préalablement immobilisée. L'aptamère MS2 reconnaît la protéine du même nom, permettant ainsi de récupérer RyhB et sa cible par élution de la colonne (Lalaouna *et al.*, 2015).

En sachant que la technique du MAPS montre un lien entre l'hémolysine et le régulateur de l'homéostasie du fer RyhB, le but de l'étude était de mettre en évidence la régulation de l'expression de l'hémolysine par l'homéostasie du fer via les régulateurs Fur et RyhB. Pour cela il a fallu, en premier lieu, confirmer le lien entre la production d'hémolysine et l'homéostasie du fer en vérifiant que les différents mutants fur et / ou ryhB produisent différemment l'hémolysine. Ensuite, il a fallu comprendre le mécanisme de régulation impliqué. Pour cela, trois hypothèses sont possibles. La première suppose que Fur réprime directement la transcription de l'hémolysine. La seconde propose que RyhB induit la dégradation du transcrit de l'hémolysine. Enfin, la dernière hypothèse est que RyhB améliore ou permet la traduction du transcrit de l'hémolysine.

Surproduction d'un sRNA marqué avec MS2 dans un mutant de la RNase E

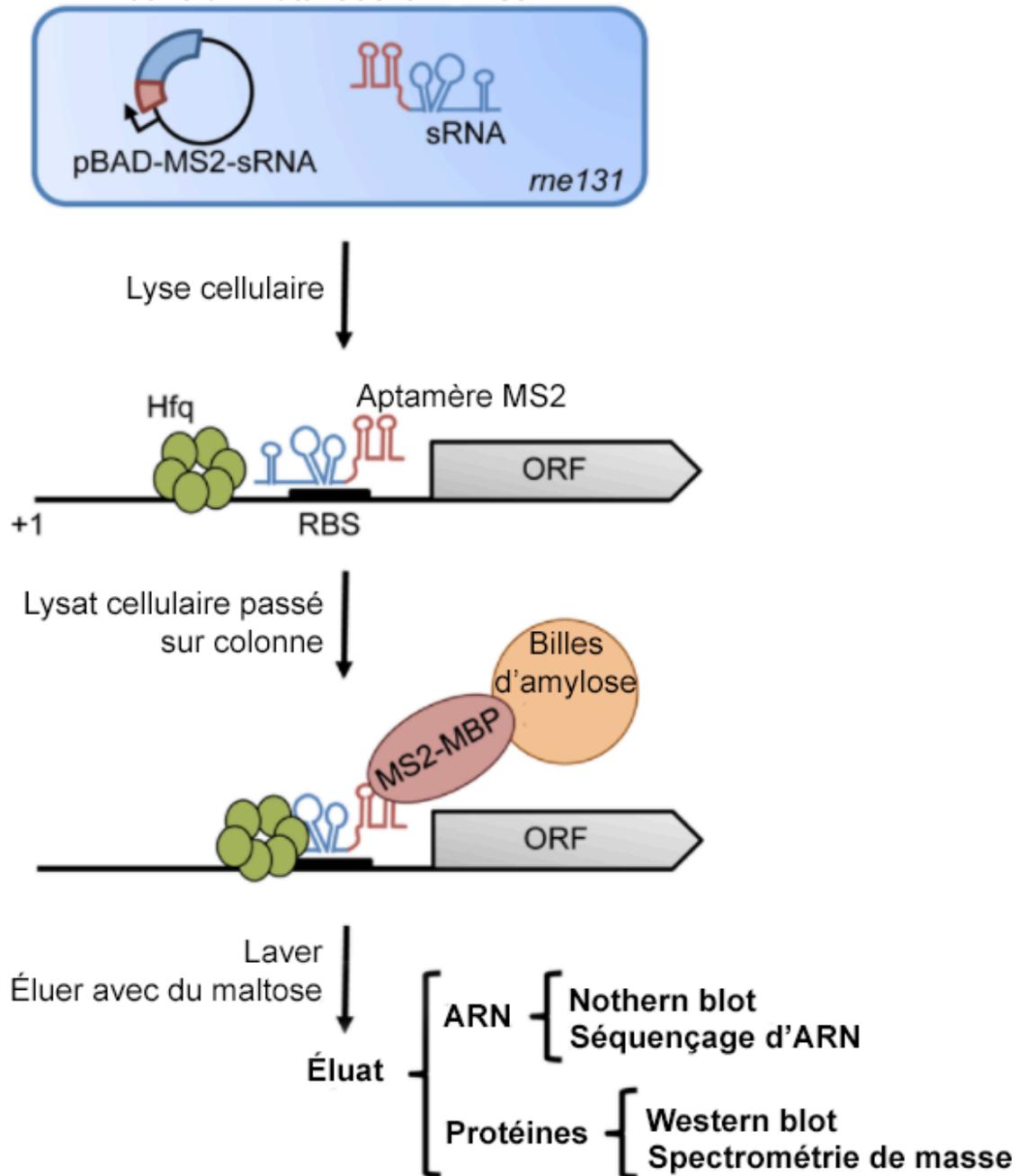


Figure 14. Fonctionnement de la technique MAPS. Le sRNA, marqué avec l'aptamère MS2, est produit en grand nombre dans une bactérie déficiente en RNase E. Le sRNA se lie à sa cible puis la bactérie est lysée. Le lysat est passé dans une colonne contenant la protéine MS2-MBP immobilisée sur des billes d'amylose. La colonne est lavée puis élue avec du maltose. L'éluat est analysé par séquençage ou Northern Blot dans le cas d'ARN, et par Western Blot ou spectrométrie de masse dans le cas de protéines. Adapté de Lalaouna *et al.* (2015).

MATERIEL ET METHODES

5. Souches bactériennes

Le tableau 2 ci-dessous liste chaque souche utilisée lors de cette étude. La souche clinique CFT073 a été isolée depuis le sang d'une femme atteinte de pyélonéphrite (Ristow *et al.*, 2016). Chaque souche est conservée à -80°C dans 25% de glycérol (v/v).

Tableau 2. Souches utilisées lors de l'étude

Souche	Génotype / Phénotype	Référence
CFT073	UPEC, O6 : H1 : K+	(Mobley et al., 1990)
QT1081	$\Delta lacZYA::FRT$	(Sabri et al., 2009)
QT2230	$\Delta rylB::cat$	(Porcheron et al., 2014)
QT2634	$\Delta fur::FRT \Delta rylB::cat$	(Porcheron et al., 2014)
QT2637	$\Delta fur::FRT$	(Porcheron et al., 2014)
QT2909	$\Delta araBAD::Gm$	Collection du laboratoire
QT2910	$\Delta rylB::cat \Delta araBAD::Gm$	Collection du laboratoire
QT2911	$\Delta fur::FRT \Delta rylB::cat \Delta araBAD::Gm$	Collection du laboratoire
QT3474	$\Delta fur::FRT \Delta lacZYA::FRT$	Collection du laboratoire
QT3475	$\Delta rylB::cat \Delta lacZYA::FRT$	Collection du laboratoire
QT3478	$\Delta fur::FRT \Delta rylB::cat \Delta lacZYA::FRT$	Collection du laboratoire
QT4774	$\Delta lacZYA::FRT$; pIJ528	Cette étude
QT4775	$\Delta lacZYA::FRT$; pIJ529	Cette étude
QT4776	$\Delta lacZYA::FRT$; pIJ526	Cette étude
QT4777	$\Delta lacZYA::FRT$; pIJ527	Cette étude
QT4778	$\Delta fur::FRT \Delta lacZYA::FRT$; pIJ528	Cette étude
QT4779	$\Delta fur::FRT \Delta lacZYA::FRT$; pIJ529	Cette étude
QT4780	$\Delta fur::FRT \Delta lacZYA::FRT$; pIJ526	Cette étude
QT4781	$\Delta fur::FRT \Delta lacZYA::FRT$; pIJ527	Cette étude
QT4782	$\Delta rylB::cat \Delta lacZYA::FRT$; pIJ528	Cette étude
QT4783	$\Delta rylB::cat \Delta lacZYA::FRT$; pIJ529	Cette étude
QT4784	$\Delta rylB::cat \Delta lacZYA::FRT$; pIJ526	Cette étude

QT4785	<i>ΔryhB::cat ΔlacZYA::FRT</i> ; pIJ527	Cette étude
QT4786	<i>Δfur::FRT ΔryhB::cat ΔlacZYA::FRT</i> ; pIJ528	Cette étude
QT4787	<i>Δfur::FRT ΔryhB::cat ΔlacZYA::FRT</i> ; pIJ529	Cette étude
QT4788	<i>Δfur::FRT ΔryhB::cat ΔlacZYA::FRT</i> ; pIJ526	Cette étude
QT4789	<i>Δfur::FRT ΔryhB::cat ΔlacZYA::FRT</i> ; pIJ527	Cette étude
QT4966	<i>PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle	Cette étude
QT4967	<i>PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle	Cette étude
QT4968	<i>Δfur::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle	Cette étude
QT4969	<i>ΔryhB::cat PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle	Cette étude
QT4970	<i>ΔryhB::cat PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle	Cette étude
QT4971	<i>Δfur::FRT ΔryhB::cat PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle	Cette étude
QT4972	<i>Δfur::FRT ΔryhB::cat PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle	Cette étude
QT4975	<i>Δfur::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle	Cette étude
QT5078	<i>ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle ; pEM1396	Cette étude
QT5079	<i>ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle ; pEM1396	Cette étude
QT5080	<i>ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle ; pEM1396	Cette étude
QT5081	<i>ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle ; pEM1396	Cette étude
QT5082	<i>Δfur ::FRT ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle ; pEM1396	Cette étude
QT5083	<i>Δfur ::FRT ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT ; PhlyCA::luxCDABE attTn7</i> Traductionnelle ; pEM1396	Cette étude
QT5085	<i>ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle ; pNM12	Cette étude
QT5086	<i>ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle ; pNM12	Cette étude
QT5087	<i>ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle ; pNM12	Cette étude
QT5088	<i>ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Traductionnelle ; pNM12	Cette étude
QT5089	<i>Δfur ::FRT ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT PhlyCA::luxCDABE</i> Transcriptionnelle ; pNM12	Cette étude
QT5090	<i>Δfur ::FRT ΔryhB::cat ΔaraBAD::FRT ; PhlyCA::luxCDABE attTn7</i> Traductionnelle ; pNM12	Cette étude
χ7213	<i>thi-1 thr-1 leuB6 supE44 tonA21 lacY1 recA RP4-2-Tc::Mu λpir ΔasdA4 Δzfh-2::Tn10</i>	(Roland et al., 1999)
DH5α	F- λ- Φ80 <i>Δ(lacZYA-argF) endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Bethesda Research Laboratories
DH5απ	<i>endA1 hsdR17 glnV44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 φ80dlacΔ(lacZ)M15 Δ(lacZYA-argF)U169 zdg-232::Tn10 uidA::pir+</i>	(Platt et al., 2000)

6. Conditions de culture

Les bactéries ont été poussées de routine en milieu LB, aussi bien en bouillon que sur milieu gélosé, contenant 1,5 % d'Agar. Ce milieu riche est composé d'extrait de levures et de peptone, un hydrolysate de protéines, il a été préparé selon les instructions du fabricant (Alpha Biosciences, Baltimore, MD, É.-U.). Le milieu M63 est un milieu minimal, mimant les conditions de carence en fer. Il contient 39 mM de KH_2PO_4 , 80 mM de K_2HPO_4 et 15 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pH 7,5. Il est supplémenté avec 1 mM de MgCl_2 , 0,1 mM de CaCl_2 et 0,6 % de glycérol. Enfin, des géloses contenant 5% de sang de mouton dans du TSA (VWR, Radnor, PA, USA) ont été utilisées pour constater les phénotypes hémolytiques.

Dans certains cas, des antibiotiques ont été ajoutés à des fins de sélection ou bien de conservation de plasmides, présentés dans le tableau 3 ci-dessous. L'ampicilline est utilisée à une concentration de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ pour le chloramphénicol, la gentamicine à hauteur de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et la kanamycine à 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Tableau 3. Plasmides utilisés lors de l'étude

Nom	Caractéristiques	Source
pRS414	Multicopies ; ColE1 ; Amp ^R	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pIJ526	Fusion traductionnelle <i>PhlyC::lac</i> ; Amp ^R	Cette étude
pIJ527	Fusion traductionnelle <i>PhlyCA::lac</i> ; Amp ^R	Cette étude
pRS415	Multicopies ; ColE1 ; lacZ sans ATG ; Amp ^R	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pIJ528	Fusion transcriptionnelle <i>Phly::lac</i> ; Amp ^R	Cette étude
pIJ529	Fusion transcriptionnelle <i>PhlyCA::lac</i> ; Amp ^R	Cette étude
pGP Tn7 Cm	pGP-Tn7-FRT::Cm; Amp ^R , Cm ^R	(Crepin <i>et al.</i> , 2012a)
pIJ534	Fusion transcriptionnelle <i>PhlyCA/lux</i> ; Amp ^R , Cm ^R	Cette étude
pIJ535	Fusion traductionnelle <i>PhlyCA/lux</i> ; Amp ^R , Cm ^R	Cette étude
pGP Tn7 Gm	pGP704::Tn7-Gm; Amp ^R , Gm ^R	(Crepin <i>et al.</i> , 2012b)
pIJ536	Fusion transcriptionnelle <i>PhlyCA/lux</i> ; Amp ^R , Gm ^R	Cette étude
pIJ537	Fusion traductionnelle <i>PhlyCA/lux</i> ; Amp ^R , Gm ^R	Cette étude

pSTNSK	pST76-K:: <i>tnsABCD</i> ; Km ^R	(Crepin <i>et al.</i> , 2012b)
pCP20	FLP ⁺ , λ ci857 ⁺ , λ P _R Rep ^{ts} ; Amp ^R , Cm ^R	(Cherepanov <i>et al.</i> , 1995)
pNM12	Dérivé de pBAD ; Amp ^R	(Majdalani <i>et al.</i> , 1998)
pEM1396	pBAD-RyhB ; Amp ^R	(Masse <i>et al.</i> , 2003)

7. Réactions de polymérase en chaine

La réaction de polymérase en chaine, ou PCR, a été utilisée pour confirmer des génotypes, en utilisant la Taq FroggaMix (FroggaBio, North York, ON, Canada). La PCR a également servi pour amplifier des régions spécifiques d'ADN, dans ce cas c'est l'enzyme Universal Hot Start High Fidelity (BioTool, Burlington, ON, Canada) qui a été utilisée. Chaque amplification a été faite sur 30 cycles et a été suivie d'une électrophorèse d'une heure sur gel d'agarose 0,8 % pour lire les résultats. Enfin, les résultats de PCR ont été purifiés avec des kits provenant de Bio Basic (Markham, ON, Canada) ou bien de New England Biolabs (Ipswich, MA, É.-U.). Toutes les amorces ayant été utilisées lors de cette étude sont listées dans le tableau 4 ci-dessous.

Tableau 4. Amorces utilisées lors de l'étude

Inventaire	Séquence (5' – 3')	Localisation / Utilisation
CMD1072	CACCAATCTTCTACACCGTTCCGC	Gène <i>glmS</i> Criblage de l'intégration des fusions <i>lux</i> au site <i>attTn7</i>
CMD1297	TAAGACATTCATCGCGCTTG	Gène <i>aacC1</i> Criblage de l'intégration des fusions <i>lux</i> au site <i>attTn7</i>
CMD1298	CGATTTCCGGCAGTTTCTAC	Gène <i>cat</i> Criblage de l'intégration des fusions <i>lux</i> dans le plasmide pGP Tn7 Cm
CMD1420	TTCGGTCAAGTTCTGGACCAGTT	MCS de pGP Tn7 Gm Criblage de l'intégration des fusions <i>lux</i> dans le plasmide pGP Tn7 Gm
CMD2134	AGGAATTGGGGATCGGAATTCGGGTAATTTCCGGAAGGGCGGTAG	Promoteur supposé d' <i>hlyCABD</i> Amplification et criblage de la région <i>hly</i> et du promoteur, fusions lac
CMD2135	CGTTGTAAAACGACGGGATCCCCACCTGTTAATGAAAAATTGAAATCTGTC	Gène <i>hlyC</i> Amplification et criblage de <i>hlyC</i> et du promoteur, fusion lac traductionnelle
CMD2136	CGTTGTAAAACGAGGGGATCCGCTGCTGATGCTGTCAAAGTTATTGAGTTCCG	Gène <i>hlyA</i> Amplification et criblage de <i>hlyCA</i> et du promoteur, fusion lac traductionnelle
CMD2137	TTTCATCGGTTGTCCGGATCCCCAGAGCCAGGATACATGCCC	Gène <i>hlyC</i> Amplification et criblage de <i>hlyC</i> et du promoteur, fusion lac transcriptionnelle
CMD2138	TTTCATCGGTTGTCCGGATCCTGTGGCACAGCCCAGTAAGATTGC	Gène <i>hlyA</i> Amplification et criblage de <i>hlyCA</i> et du promoteur, fusion lac transcriptionnelle
CMD2198	GAAGCTAATTCGATCATGCATGAGCTCCCTGAAAATTATTACCGC GC	Promoteur supposé d' <i>hlyCABD</i> Amplification et criblage de la région <i>hly</i> et du promoteur, fusions lux
CMD2199	GAGGTGGGCCCCATGCTCGAGTGCTGATGCTGTCAAAGTTA	Gène <i>hlyA</i> Amplification et criblage de <i>hlyCA</i> et du promoteur, fusion lux traductionnelle
CMD2200	GAGGTGGGCCCCATGCTCGAGTTATGCTGATGCTGTCAAAG	Gène <i>hlyA</i> Amplification et criblage de <i>hlyCA</i> et du promoteur, fusion lux transcriptionnelle

8. Phénotype hémolytique

Le phénotype hémolytique d'une souche bactérienne est facilement observable sur boîte à gélose avec sang. C'est pourquoi il a été choisi comme premier indicateur de possibles effets des mutations subies par CFT073 sur la production d'hémolysine.

Pour confirmer un phénotype précédemment observé, les souches à tester, soit CFT073, les mutants $\Delta fur::FRT$, $\Delta rylB::cat$ et $\Delta fur::FRT \Delta rylB::cat$, ainsi que les souches complémentées ont été mises en culture en bouillon LB pour la nuit. Le lendemain, des gouttes de 10 μ L de chacun des bouillons ont été déposées sur une gélose au sang de mouton. L'influence d'une supplémentation avec 10 mM de calcium, sous forme de $CaCl_2$, mais aussi de la présence d'antibiotiques dans les bouillons, ont été testés. Chaque condition a été vérifiée sur trois géloses au sang de mouton différentes. Les bouillons ont ensuite été centrifugés à 4 000 rpm pendant quatre minutes, puis filtrés pour s'assurer de ne pas avoir de bactéries dans les surnageants de culture. De la même façon, des gouttes de 10 μ L de chaque surnageant ont été déposées sur une gélose au sang de mouton. L'expérience a été également effectuée trois fois et les mêmes conditions ont été testées. Les géloses ont été incubées à 37°C et surveillées régulièrement pour constater l'apparition des halos d'hémolyse.

Pour quantifier l'hémolyse sur des géloses au sang de mouton, les souches à tester, soit CFT073 ainsi que les mutants $\Delta fur::FRT$, $\Delta rylB::cat$ et $\Delta fur::FRT \Delta rylB::cat$, ont été mises en culture en bouillon pour la nuit. Le lendemain, l'absorbance de chaque bouillon a été mesurée. Puis, cette absorbance a été mise en correspondance avec le nombre de bactéries par millilitres de culture, à l'aide de la courbe de calibration du spectrophotomètre. Les bactéries ont ensuite été lavées une fois dans de la saline et leur concentration a été ajustée pour obtenir entre 100 et 1 000 CFU/mL. 100 μ L de chaque culture a été étalée sur une gélose au sang de mouton pour obtenir des colonies isolées puis placées à 37°C pour la nuit. Le lendemain, les boîtes ont été prises en photos à l'aide du système d'analyse d'image de type GelDoc, ChemiGenius² (Syngene, Frederick, MD, USA), avec une règle pour marquer l'échelle. Puis les diamètres ont été mesurés avec le logiciel SalsaJ (Associations « Hands-On Universe » européenne et française, Université Pierre et Marie Curie).

9. Activité enzymatique de la β galactosidase

La β galactosidase est une enzyme hydrolysant le β -D-galactose en galactose et en glucose (Miller, 1972, Weaver, 2012). Son activité est facilement mesurable à l'aide de l'orthonitrophényl- β -galactoside, ou ONPG, qui est incolore, mais dont l'hydrolyse par la β galactosidase libère du galactose et de l'o-nitrophénol, ce dernier produit une couleur jaune quantifiable en mesurant l'absorbance à 420 nm.

La β galactosidase est codée par le gène *lacZ*, de l'opéron *lac*. Cet opéron contient également les gènes *lacY*, qui code pour la perméase permettant le transport des galactosides dans la cellule, et *lacA*, codant pour la galactosidase transacétylase (Weaver, 2012). Ici, les gènes *lacZYA*, des plasmides pRS415 et pRS414, sont fusionnés à la région du promoteur de l'opéron *hly*, afin d'obtenir des fusions transcriptionnelles et traductionnelles, comme représenté en figure 15. La β galactosidase ainsi produite a permis de comparer la transcription et la traduction de l'hémolysine par CFT073 et ses différents mutants.

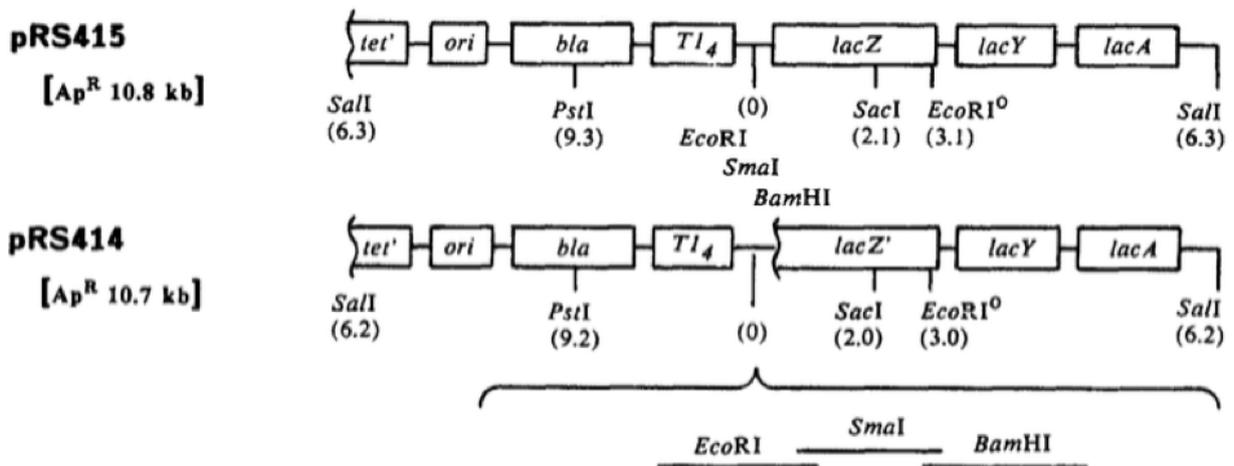


Figure 15. Organisation de l'opéron *lac* dans les plasmides de fusion multicopies, pRS415 et pRS414. *tet'* est un gène permettant la résistance à la tétracycline, *bla* permet la résistance à l'ampicilline. *ori* est une origine de répllication et *Tl₄* représente quatre copies en tandem d'un terminateur de transcription fort. Le site d'insertion de la fusion est indiqué au (0), juste devant l'opéron *lacZYA*. Adapté de Simons *et al.* (1987).

Construction de plasmides avec fusions transcriptionnelle et traductionnelle. Tout d'abord, les produits d'ADN ont été amplifiés par PCR avec l'amorce CMD2134, couplée avec les amorces CMD2135 à CMD2138 en utilisant l'enzyme Universal Hot Start High Fidelity. Après avoir effectué une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % pour en vérifier la pureté, les échantillons ont été purifiés à l'aide d'un kit dédié (BioBasic, Markham, ON, Canada).

Les produits d'ADN, représentés en figure 16, ont été conçus *in silico* et débutent tous 518 paires de bases, pb, avant le début du gène *hlyC*, région contenant le promoteur supposé de l'opéron. Le premier produit pour la fusion traductionnelle est appelé *PhlyC*, il contient le promoteur supposé et le gène *hlyC* sans son codon stop. Cette fusion permet de comprendre l'influence de la région 5' non traduite et du gène *hlyC* sur la traduction du transcrit. Le deuxième produit pour la fusion traductionnelle est appelé *PhlyCA*, il contient le promoteur supposé et les gènes *hlyC* et *hlyA*. Cette fusion permettra, en plus, de connaître l'influence du gène *hlyA* sur la traduction de l'ARNm. Le premier produit pour la fusion transcriptionnelle est appelé *Phly*, ce produit contient le promoteur supposé et le début de *hlyC*. Cette fusion permet de connaître l'effet du promoteur seul dans la transcription de l'opéron *hly*. Le deuxième produit pour la fusion transcriptionnelle est appelé *PhlyCA*, il contient le promoteur supposé, les gènes *hlyC* et *hlyA* ainsi que les 43 paires de bases après la fin du gène *hlyA*. Cette fusion permet de savoir si les gènes *hlyC* et *hlyA* jouent un rôle dans l'expression de l'opéron.

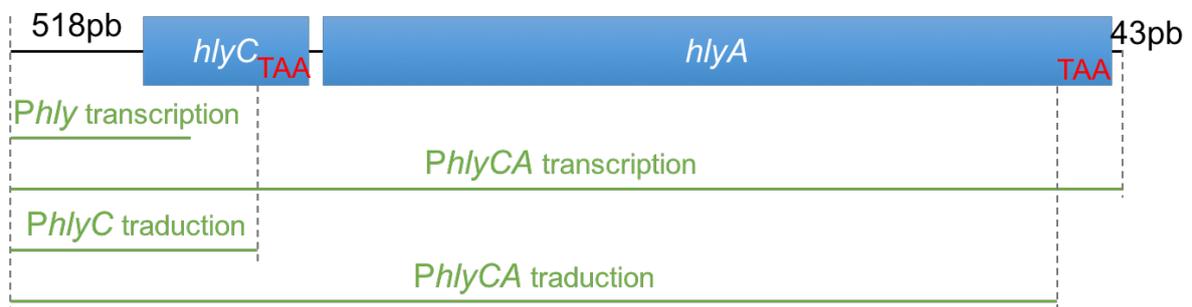


Figure 16. Régions de l'opéron *hlyCABD* utilisées dans les fusions lactose. Les gènes de l'opéron *hlyCABD*, provenant de CFT073, sont représentés en bleu et les produits d'ADN, amplifiés par PCR, sont représentés en vert.

Les plasmides de fusion ont été digérés par les enzymes EcoRI et BamHI (Fermentas, Waltham, MA, É.-U.). Les produits de PCR y ont été introduits par Quick Fusion (BioTool), puis la réaction a été transformée dans la souche DH5 α par choc thermique. Cette technique de transformation consiste à mettre les bactéries en présence du plasmide à transformer pendant une demi-heure sur glace, puis elles sont transférées 90 secondes dans un bain marie à 42 °C et laissées cinq minutes sur glace avant d'être remises en conditions de culture.

La présence du plasmide dans les bactéries a été vérifiée par ajout d'ampicilline dans le milieu de culture. Les bactéries qui ont acquis la résistance à l'ampicilline ont ensuite été discriminées pour ne sélectionner que celles ayant acquis le plasmide contenant la fusion. Pour cela, une PCR a été faite sur les lysats de ces bactéries, avec les mêmes amorces que celles ayant permis l'amplification des produits de PCR, mais avec l'enzyme 2X Taq FroggaMix. Après avoir effectué une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % pour en vérifier la pureté, les plasmides de fusion ont été extraits à l'aide d'un kit dédié. Les cartes des plasmides obtenus, pIJ526 à pIJ529 sont visibles en annexe, figures S1 à S4.

Obtention des souches contenant les plasmides de fusion. Les plasmides extraits ont été transformés dans les souches CFT073 Δlac QT1081, QT3474, QT3475 et QT3478. La même PCR que précédemment a été effectuée pour vérifier que l'acquisition de la résistance à l'ampicilline par les bactéries était bien due à la présence des plasmides contenant la fusion désirée.

Mesure de l'activité de la β galactosidase. Les souches obtenues ont été mises en culture pour la nuit en bouillon LB puis relancées au 1/100^e le matin même pour obtenir une absorbance souhaitée à 600 nm, puis ajustée à $DO_{600\text{ nm}} = 0,6$. Chaque culture a ensuite été mélangée avec du tampon Z (60 nM $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 40 nM NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 50 mM β -mercaptoéthanol, pH 7) dans des proportions comprises entre 1:9 et 1:1 pour obtenir 1 mL final. Ensuite, 20 μ L de chloroforme, ainsi que 10 μ L de SDS 0,1 % ont été ajoutés puis les tubes ont été vortexés 10 secondes pour permettre la lyse des bactéries. Chaque tube a été incubé cinq minutes à 28 °C au bain-marie. Puis, 0,2 mL d'ONPG à 4 mg/mL dans du tampon Z ont été ajoutés. Lorsque la coloration a été jugée assez développée, la réaction a été arrêtée par l'ajout de 0,5 mL Na_2CO_3 1 M. En effet, le pH monte à 11, ce qui inactive la β galactosidase, le temps de réaction est noté (Miller, 1972).

Chaque tube est centrifugé quelques minutes à vitesse maximale pour culotter les débris cellulaires. Enfin, les absorbances sont mesurées à 420 nm, qui est l'absorbance de l'o-nitrophénol mais aussi des débris cellulaires, et à 550 nm, où seuls les débris cellulaires absorbent. Cette absorbance à 550 nm est proportionnelle à celle qu'ils ont à 420 nm. Pour *E. coli*, un facteur de correction, défini à 1,75, permet de compenser cette absorbance indésirable à 420 nm (Miller, 1992). Les unités enzymatiques sont ainsi calculées par l'équation suivante :

$$\text{Activité } \beta - \text{galactosidase} = \frac{1000 \times (DO_{420\text{ nm}} - 1,75 \times DO_{550\text{ nm}})}{t_{\text{réaction}} \times V_{\text{culture}} \times DO_{600\text{ nm}}}$$

Dans cette équation, le temps de réaction est utilisé en minutes et le volume de culture ajouté au tampon Z est utilisé en millilitres. Enfin, le résultat est donné en unités Miller, qui sont proportionnelles à l'augmentation de la quantité d'o-nitrophénol par min et par bactéries (Miller, 1972).

10. Activité de luminescence

Une façon plus précise de mesurer la transcription et la traduction associées à la production de l'hémolysine est l'utilisation des gènes rapporteurs codants pour la luciférase. En effet, en présence de substrats adéquats celle-ci permet l'émission de lumière visible, et quantifiable, directement dans l'organisme vivant, c'est la bioluminescence (Clark *et al.*, 2011, Meighen, 1993). La luciférase est une enzyme catalysant l'oxydation de la flavine mono-nucléotide sous sa forme réduite et d'acides gras à chaîne longue, c'est cette réaction enzymatique, montrée ci-dessous, qui produit une lumière bleu-verte (Clark *et al.*, 2011, Madigan, 2012, Meighen, 1993).



La luciférase est codée par les gènes *luxA* et *luxB*, codant respectivement pour les sous unités α et β , celle-ci étant active sous la forme d'un hétérodimère $\alpha\beta$ (Meighen, 1993). Les gènes *luxC*, *luxD* et *luxE* codent pour les polypeptides nécessaires à la synthèse des substrats de la luciférase, c'est à dire une transférase, une synthétase et enfin une réductase (Meighen, 1993). Les gènes *luxCDE* flanquent les gènes *luxAB*, formant ainsi l'opéron *luxCDABE*, montré en figure 17 ci-dessous (Clark *et al.*, 2011, Madigan, 2012, Meighen, 1993).



Figure 17. Organisation et carte de restriction de l'opéron *lux* de *Photobacterium luminescens* ATCC29999. Le gène *luxC* code pour une transférase, *luxD* code pour une synthétase et *luxE* code pour une réductase. Ces gènes permettent la synthèse des substrats de la luciférase dont les deux sous unités sont codées par les gènes *luxA* et *luxB*. (Winson *et al.*, 1998).

La fusion est placée entre les fragments Tn7-L de 150 paires de bases et Tn7-R de 90 paires de bases du transposon Tn7. Ceci permettra à la fusion d'être intégrée, à l'aide des transposases TnsABCD, directement dans le génome de CTF073, au site *attTn7*, placé à l'extrémité 3' du gène *glmS*. Ce gène est hautement conservé, car il joue un rôle primordial dans la synthèse du N-acétyl glucosamine, composant du peptidoglycane. Les protéines TnsA et TnsB sont les transposases qui reconnaissent les segments Tn7-L et Tn7-R, excisent le transposon du site donneur et l'insèrent au site *attTn7*. La protéine TnsC est une hydrolase d'ATP permettant l'excision et l'insertion de Tn7. Enfin, TnsD reconnaît le site *attTn7* pour y permettre l'insertion du transposon sans détruire le gène *glmS* (Peters *et al.*, 2001). L'intégration permet d'éviter la présence de sites de liaison de Fur inopportuns sur le plasmide, mais aussi la possibilité d'avoir des plasmides multicopies qui fausseraient la régulation.

Construction des plasmides de fusion. Tout d'abord, le plasmide pGP Tn7 Cm a été extrait à l'aide d'un kit dédié en suivant les instructions du fournisseur (BioBasic). Il a ensuite été linéarisé par digestion à l'aide des enzymes de restriction ScaI et XhoI (New England Biolabs). Dans le même temps, les produits d'ADN ont été amplifiés par PCR en utilisant l'amorce CMD2198 couplée aux amorces CMD2199 ou CMD2200 et l'enzyme "Universal Hot Start High Fidelity". Après que la pureté des produits ait été constatée par électrophorèse, les produits de PCR ont été purifiés à l'aide d'un kit dédié en suivant les instructions du fournisseur (New England Biolabs). Les produits de PCR ont été introduits dans les plasmides par Quick Fusion (BioTool) puis la réaction a aussitôt été transférée dans la souche DH5α par choc thermique.

Les produits d'ADN, représentés en figure 18, ont été conçus *in silico* et débutent tous 780 paires de bases, pb, avant le début du gène *hlyC*, région contenant le promoteur supposé de l'opéron *hly*. Le premier produit d'ADN, pour la fusion transcriptionnelle, contient le promoteur supposé et les gènes *hlyC* et *hlyA*. Cette fusion permet d'étudier l'influence de la régulation de Fur sur la transcription de l'opéron *hly*. Le deuxième produit d'ADN, pour la fusion traductionnelle, contient le promoteur supposé et les gènes *hlyC* et *hlyA*, le codon stop de *hlyA* n'étant pas inclus. Cette fusion permet d'étudier l'influence de la régulation de RyhB sur la traduction de l'opéron *hly*.

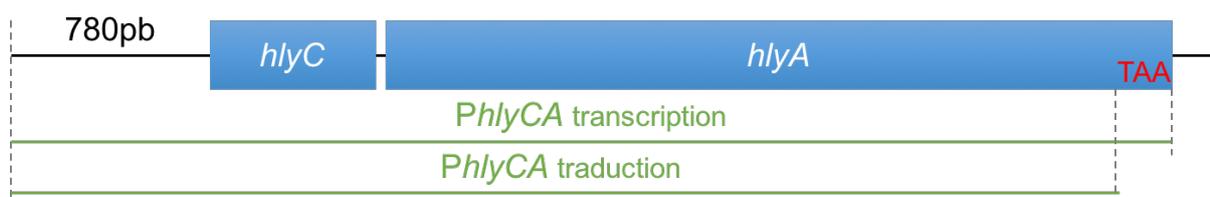


Figure 18. Régions de l'opéron *hlyCABD* utilisées dans les fusions luciférase. Les gènes de l'opéron *hlyCABD*, provenant de CFT073, sont représentés en orange et les produits d'ADN, amplifiés par PCR, sont représentés en vert.

La présence du plasmide dans les bactéries a été vérifiée par ajout de chloramphénicol dans le milieu de culture. Les bactéries qui en ont acquis la résistance ont ensuite été discriminées pour ne sélectionner que celles ayant acquis le plasmide contenant la fusion. Pour cela, une PCR a été faite sur les lysats de ces bactéries, avec les mêmes amorces que celles ayant permis l'amplification des produits de PCR, mais avec l'enzyme 2X Taq FroggaMix. Après avoir effectué une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % pour en vérifier la pureté, les plasmides de fusion ont été extraits à l'aide d'un kit dédié (BioBasic).

Ensuite, le plasmide pGP Tn7 Gm a été extrait à l'aide d'une trousse dédiée en suivant les instructions du fournisseur (BioBasic). pGP Tn7 Gm a été linéarisé à l'aide des enzymes de restriction SmaI et KpnI (New England Biolabs) et la fusion a été récupérée depuis le plasmide pGP Tn7 Cm par digestion avec ces mêmes enzymes. Une électrophorèse a été nécessaire pour séparer les différents morceaux de plasmide linéarisés afin de les purifier à l'aide d'un kit dédié (BioBasic). La fusion et le plasmide ont ensuite été ligués à l'aide de la T4 DNA Ligase (New England Biolabs) puis la ligation a été transformée par choc thermique dans la souche DH5 α .

La présence du plasmide dans les bactéries a été vérifiée par ajout de gentamicine dans le milieu de culture. Les bactéries qui en ont acquis la résistance ont ensuite été discriminées pour ne sélectionner que celles ayant acquis le plasmide contenant la fusion. Pour cela, une PCR a été faite sur les lysats de ces bactéries, avec les mêmes amorces que celles ayant permis l'amplification des produits de PCR, mais avec l'enzyme 2X Taq FroggaMix. Après avoir effectué une électrophorèse sur gel d'agarose 0,8 % pour en vérifier la pureté, les plasmides de fusion ont été extraits à l'aide d'un kit dédié (BioBasic). Les cartes des plasmides obtenus, pIJ536 et pIJ537, sont visibles en annexe, figures S5 et S6.

Obtention des souches contenant la fusion lux. Les plasmides de fusion ainsi obtenus ont été transformés par choc thermique dans la souche χ 7213. En effet, le plasmide pGP Tn7 est un vecteur suicide qui a besoin de la protéine pi, absente chez CFT073, mais présente chez χ 7213 pour sa réplique (Crepin *et al.*, 2012a). Dans le même temps, le plasmide pSTNSK, présenté en figure S7, a été transformé dans CFT073 et les mutants $\Delta fur::FRT$, $\Delta rylB::cat$ et $\Delta fur::FRT \Delta rylB::cat$ par électroporation. Ce plasmide thermosensible contient les gènes des transposases *tnsABCD* nécessaires à la mobilisation de Tn7 (Crepin *et al.*, 2012a). Enfin, l'intégration de la fusion s'est faite par conjugaison ou par électroporation du plasmide pGP Tn7 Gm contenant la fusion dans les CFT073 récalcitrantes.

L'intégration au site *attTn7* a été vérifiée par ajout de gentamicine ou d'ampicilline dans le milieu de culture. Les bactéries résistantes à la gentamicine et sensibles à l'ampicilline ont ensuite été discriminées pour ne sélectionner que celles ayant intégré la fusion. La production de luminescence a aussi été vérifiée à l'aide du système d'imagerie GelDoc (Syngene). Aussi, une PCR a été faite sur les lysats de ces bactéries, avec les amorces CMD1072, CMD1297 et l'enzyme 2X Taq FroggaMix. La présence d'une bande sur gel d'agarose 0,8 % après électrophorèse atteste que l'intégration s'est bien faite au site *attTn7*.

Le plasmide pNM12 est dérivé du plasmide pBAD24 où un site MclI a été ajouté avant le site d'initiation de la transcription (Majdalani *et al.*, 1998). La caractéristique des plasmides pBAD24 ou pNM12 est la présence du promoteur P_{BAD}. En présence d'arabinose, la transcription des gènes en aval du promoteur est initiée, en son absence, la transcription a lieu à de très faibles niveaux, enfin, en présence de glucose la transcription est presque totalement réprimée (Guzman *et al.*, 1995).

Enfin, dans l'optique d'effectuer des cinétiques pour étudier l'effet de l'induction de la production de RyhB, il a été nécessaire d'utiliser des souches dépourvues de l'opéron *araBAD*, montré en figure 19. En effet, *Escherichia coli* est capable d'utiliser le L-arabinose comme une source d'énergie et de carbone grâce aux gènes *araA*, *araB*, *araC* et *araD*. Les gènes *araA*, *araB* et *araD* codent, respectivement, pour une isomérase, une kinase et une épimérase qui permettent la conversion du L-arabinose en D-xylulose-5-phosphate qui entrera ensuite dans la voie des pentoses phosphates. Le gène *araC*, quant à lui, code pour l'activateur permettant la synthèse des autres protéines de l'opéron *ara* (Schleif, 2010).

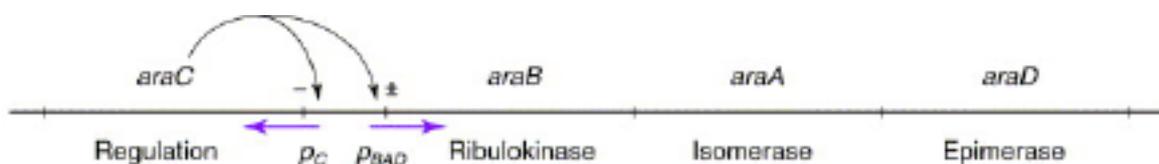


Figure 19. Organisation de l'opéron *ara*. Le gène *araC* code pour l'activateur de la transcription des autres gènes de l'opéron. Le gène *araB* code pour une ribulokinase, *araA* code pour une isomérase et *araD* code pour une épimérase, tous permettent le catabolisme du L-arabinose chez *Escherichia coli*. (Schleif, 2000).

Le plasmide pCP20 a été transformé dans les souches QT2909, QT2910 et QT2911 par électroporation. Ce plasmide thermosensible permet l'excision de la cassette de résistance, flanquée par deux fragments FRT, grâce à la recombinase FLP. La présence du plasmide dans les bactéries a été vérifiée par ajout d'ampicilline dans le milieu de culture. Les bactéries qui en ont acquis la résistance ont ensuite été discriminées pour ne sélectionner que celles ayant acquis pCP20. Plusieurs passages sur des milieux contenant de la gentamicine ont ensuite été effectués pour constater la disparition de la résistance à cet antibiotique, attestant que pCP20 a bien retiré la cassette. Afin d'inhiber la réplication du plasmide pCP20, les souches obtenues ont été mises en culture en bouillon quelques heures à 39 °C puis isolées sur milieu solide avant d'être mises en culture pour la nuit à 37 °C. En utilisant la même méthode que précédemment, les souches subissent une conjugaison afin d'obtenir la fusion *hly::lux* intégrée au site *attTn7*. Enfin, les plasmides pNM12 et pEM1396 ont été transformés dans les souches par choc thermique. La surexpression de *ryhB* par pEM1396 a été vérifiée par Northern Blot (Masse *et al.*, 2005).

Mesure de la luminescence. Chaque souche contenant la fusion intégrée a été mise en culture en bouillon pour la nuit. Après un lavage, chacune a été répartie dans une plaque 96 puits de façon à obtenir une densité optique de 0,05 à 600 nm. Les bactéries ont été mises en culture dans un Cytation3 (BioTek, Winooski, VT, É.-U.) à 37 °C sous agitation orbitale pendant 24 heures, où la luminescence, ainsi que la densité optique à 600 nm de chaque puits ont été mesurées toutes les 15 minutes. Les milieux LB et M63 glycérol ont été comparés, ainsi que l'ajout de 10 µM de chlorure de fer (III) ou de 100 µM de dipyridyl, un chélateur du fer.

Dans le cas des souches contenant la fusion intégrée et l'un des plasmides inductibles, chaque souche a été inoculée au 1/100^e d'une culture en bouillon cultivée pendant la nuit, puis laissée en incubation sous agitation à 37 °C pour obtenir une densité optique de 0,5 à 600 nm. Chaque culture a ensuite été centrifugée 15 minutes à 2 700 rpm puis le culot bactérien a été suspendu dans le même volume de milieu contenant 0,1 % d'arabinose et 50 µg/mL d'ampicilline. Les souches ont enfin été réparties dans une plaque 96 puits puis l'absorbance à 600 nm et la luminescence ont été lues au lecteur Cytation toutes les cinq minutes pendant une heure. Ici, l'effet de l'induction de la surexpression de RyhB sur l'expression de l'hémolysine par 0,1 % d'arabinose, ou de sa répression par 0,2 % de glucose, ont été testés dans un milieu enrichi en fer par l'ajout de 10 µM de chlorure de fer (III) ou appauvri en fer par 200 µM de dipyridyl.

11. Statistiques

Tous les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel R en utilisant un niveau de confiance de 0,05, ou 5 % (Team, 2014). La distribution normale des données a été effectuée à l'aide du test de Shapiro. Dans le cas où les échantillons présentaient une distribution normale des données, ceux-ci étaient comparés à l'aide de la comparaison de variance par le test ANOVA puis par le test de comparaisons multiples de Tukey. Dans le cas contraire, c'est le test de la somme des rangs de Kruskal Wallis qui a été appliqué, suivi du test de comparaison multiple de Dunn. Tous les tests statistiques utilisés proviennent des logiciels « Stats package » (Team, 2014) ou PMCMR (Pohlert, 2015) du logiciel R.

RESULTATS

1. Vérification du phénotype hémolytique

La première étape de l'étude fut de confirmer le phénotype hémolytique observé par d'anciens étudiants du laboratoire. À savoir l'absence de halo d'hémolyse pour les mutants Δfur de CFT073. Après 3 heures d'incubation, une faible croissance était observée pour les spots des cultures, figure 20, tous présentaient de faibles halos d'hémolyse, sauf pour les mutants Δfur , figure 20B, et $\Delta fur \Delta rylhB$, figure 20D.

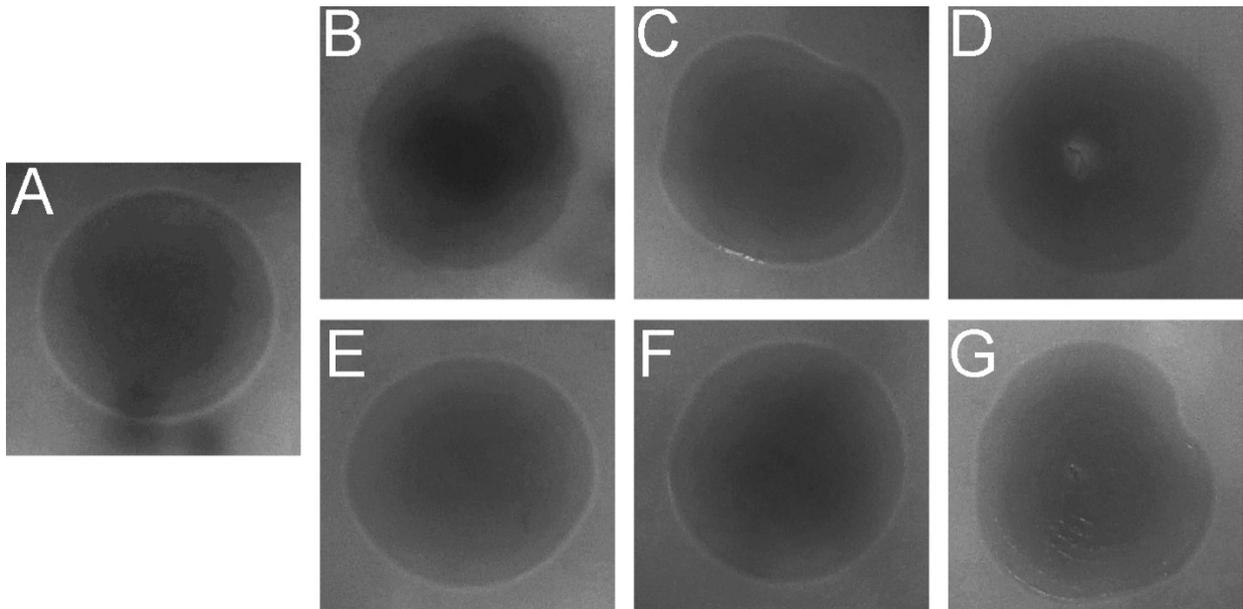


Figure 20. Croissance et hémolyse de spots de 10 μ L de bouillon de CFT073 (A) Sauvage, (B) $\Delta fur::FRT$, (C) $\Delta rylhB::cat$, (D) $\Delta fur::FRT \Delta rylhB::cat$, (E) $\Delta fur::FRT$ complémenté, (F) $\Delta rylhB::cat$ complémenté, (G) $\Delta fur::FRT \Delta rylhB::cat$ complémentés. Incubation de 3 heures à 37°C sur des géloses TSA 5% sang de mouton. Les résultats présentés sont représentatifs d'une expérience réalisée trois fois.

Après une nuit d'incubation, une forte croissance ainsi qu'un fort halo d'hémolyse ont été observés pour chacun des mutants, sans réelle distinction. La seule différence étant la présence d'un halo supplémentaire, de couleur verte, pour les spots Δfur et $\Delta fur \Delta rylhB$. Ce halo témoigne de l'acidification du milieu de culture par le métabolisme bactérien ce qui cause l'oxydation du fer dans les érythrocytes. Les données ne sont pas présentées.

Concernant les surnageants, aucune croissance ni hémolyse n'ont été observées dans aucune des deux manipulations, les données ne donc sont pas présentées.

Dans le cas des colonies isolées, dont les résultats sont présentés en figure 21, les photos prises à l'aide du ChemiGenius2 ne présentant pas de différences évidentes à l'œil nu, les diamètres des colonies et d'hémolyse associés ont été mesurés à l'aide du logiciel SalsaJ. Puis, chacun des diamètres d'hémolyse a été soustrait par le diamètre de la colonie associée. Graphiquement on peut constater de légères variations, cependant seule la différence entre les mutants Δfur et $\Delta ryhB$ est statistiquement significative.

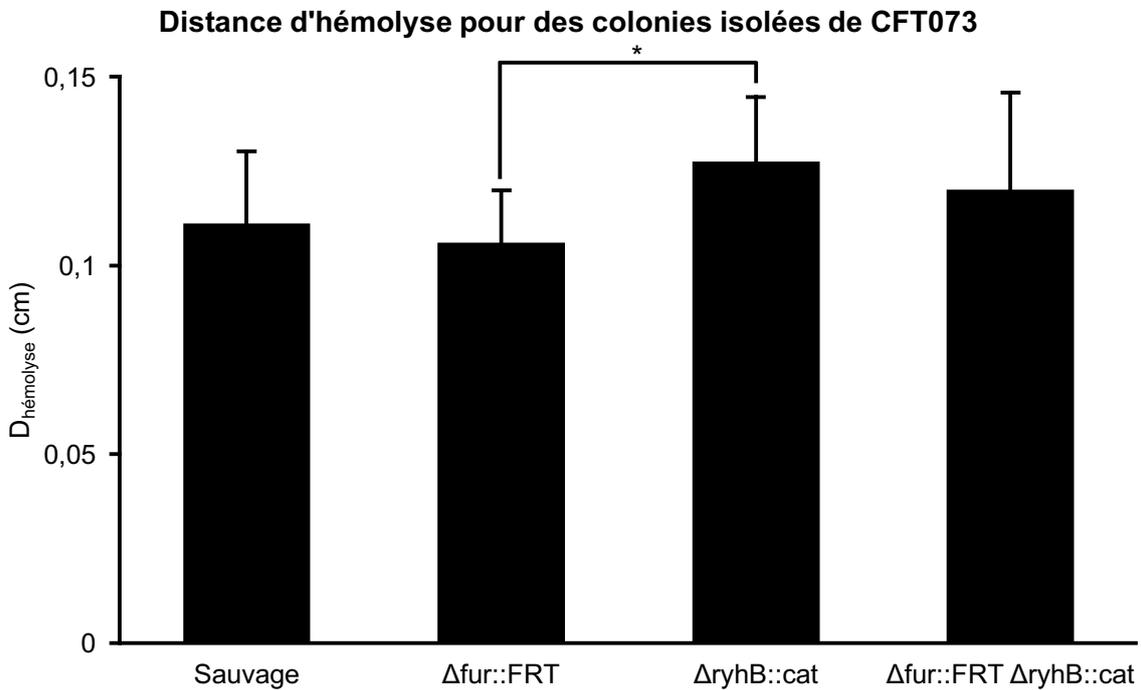


Figure 21. Distance d'hémolyse pour des colonies isolées de CFT073. Une culture incubée à 37°C pendant la nuit a été diluée de façon à obtenir des colonies isolées après étalement et incubation à 37°C pendant la nuit. Les photos ont été prises à l'aide du ChemiGenius2 et les mesures ont été faites avec le logiciel SalsaJ. Les barres d'erreur représentent les écarts types calculés entre les différentes colonies isolées d'une même gélose, dont chaque colonne représente la moyenne.

2. Détermination de la production d'hémolysine

Afin de mieux comprendre les mécanismes de régulation de l'hémolysine par Fur et RyhB, la production d'hémolysine au niveau transcriptionnel et traductionnel a également été étudiée.

2.1. Activité enzymatique de la β galactosidase

Dans le cas des fusions hly-lac, les fluctuations de l'activité enzymatique de la β galactosidase, en unités Miller reflète la transcription, ou la traduction, de l'hémolysine par la bactérie.

La première fusion transcriptionnelle, *Phly::lac*, montre des différences significatives entre $\Delta lac \Delta fur \Delta rylB$ durant la phase de latence et chacun des autres mutants, figure 22. De plus, les niveaux de transcription sont plus élevés en phase de latence.

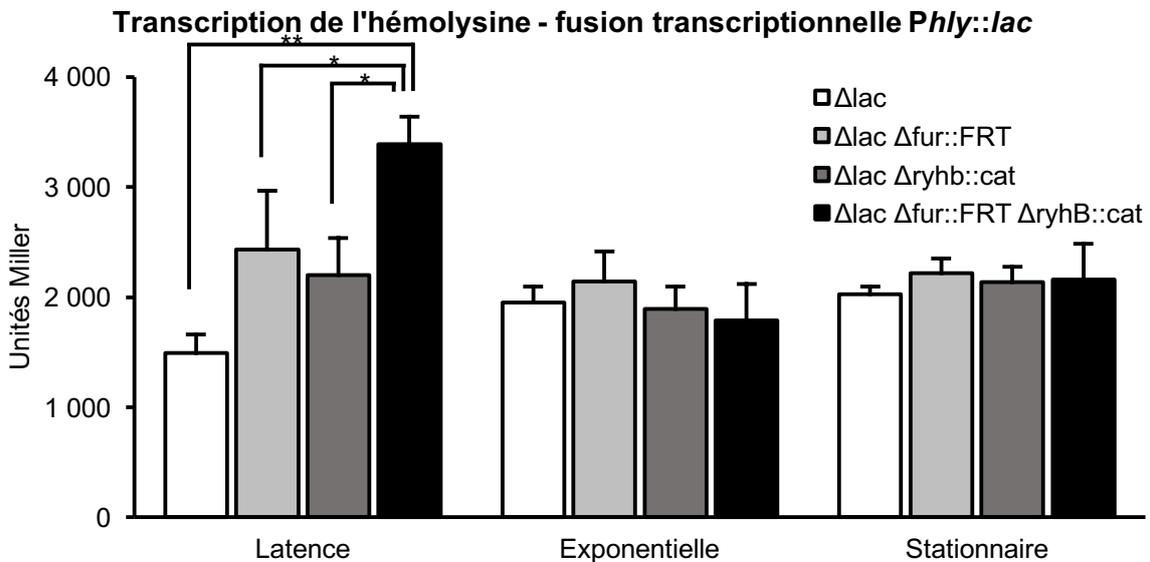


Figure 22. Transcription de l'hémolysine – fusion transcriptionnelle *Phly::lac*. Données obtenues à l'aide du protocole décrit par Miller (1992). Chaque colonne représente la moyenne de triplicats et les barres d'erreur représentent l'écart type. * : $p < 0,5$; ** : $p < 0,01$.

La deuxième fusion transcriptionnelle, *PhlyCA::lac*, montre des différences significatives entre $\Delta lac \Delta fur$ et Δlac , mais aussi avec $\Delta lac \Delta fur \Delta rylB$ durant la phase de latence, figure 23. À nouveau, les niveaux de transcription sont plus élevés en phase de latence.

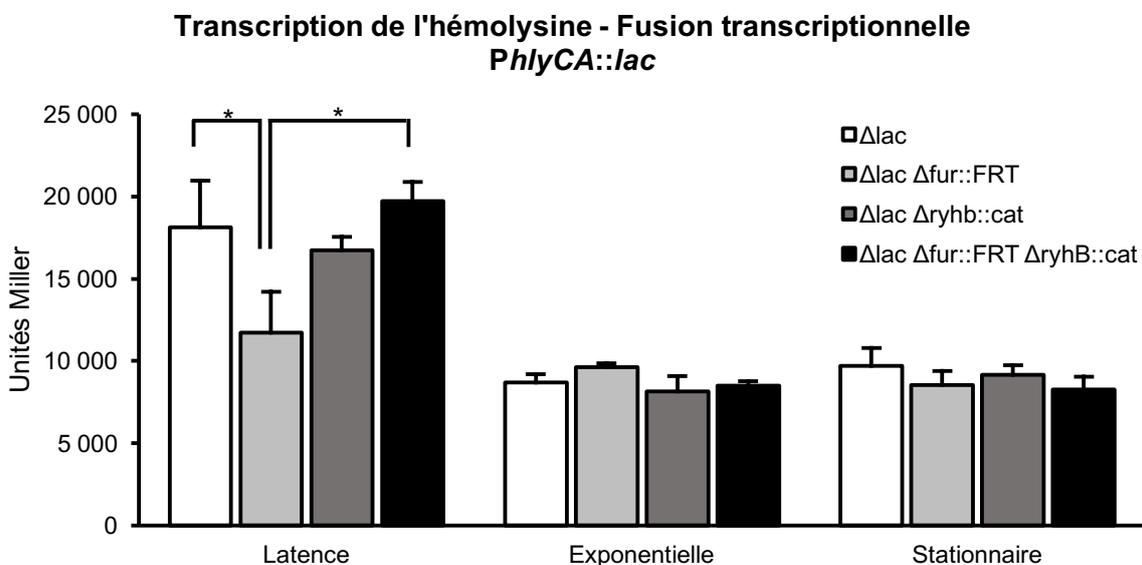


Figure 23. Transcription de l'hémolysine – fusion transcriptionnelle *PhlyCA::lac*. Données obtenues à l'aide du protocole décrit par Miller (1992). Chaque colonne représente la moyenne de triplicats et les barres d'erreur représentent l'écart type.

La première fusion traductionnelle, *PhlyC::lac*, montre des différences significatives entre Δlac et $\Delta lac \Delta fur \Delta rylB$, ainsi qu'entre $\Delta lac \Delta fur$ et $\Delta lac \Delta rylB$, mais aussi avec $\Delta lac \Delta fur \Delta rylB$ durant la phase de croissance exponentielle, figure 24. Ici, les niveaux de traduction sont plus élevés en phase exponentielle de croissance.

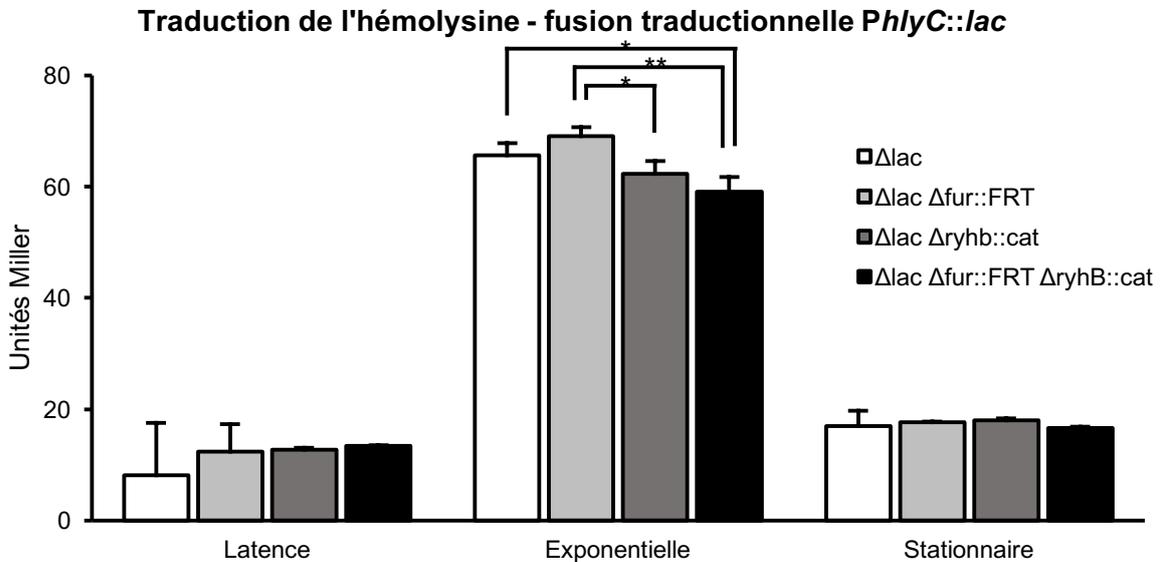


Figure 24. Traduction de l'hémolysine – fusion traductionnelle *PhlyC::lac*. Données obtenues à l'aide du protocole décrit par Miller (1992). Chaque colonne représente la moyenne de triplicats et les barres d'erreur représentent l'écart type. * : $p < 0,5$; ** : $p < 0,01$.

Enfin, la deuxième fusion traductionnelle, *PhlyCA*, figure 25, montre des différences significatives entre $\Delta lac \Delta fur$ et $\Delta lac \Delta rylB$ en phase de latence. Ici aussi, les niveaux de traduction sont plus élevés en phase exponentielle de croissance.

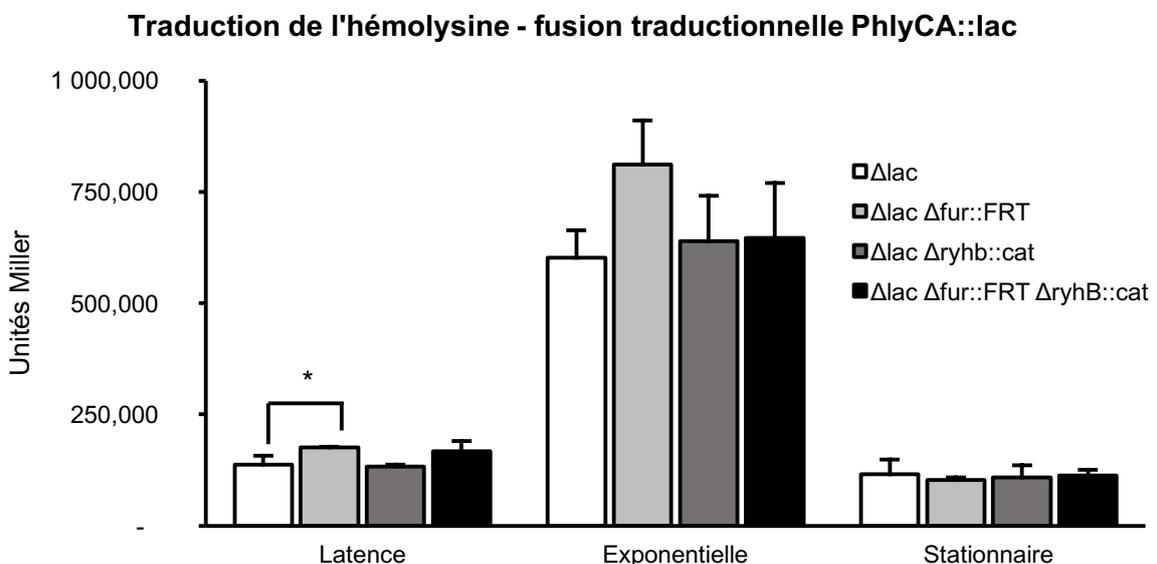


Figure 25. Traduction de l'hémolysine – fusion traductionnelle *PhlyCA::lac*. Données obtenues à l'aide du protocole décrit par Miller (1992). Chaque colonne représente la moyenne de triplicats et les barres d'erreur représentent l'écart type.

2.2. Activité lumineuse

Pour évaluer de façon plus précise et effectuer des cinétiques de la production d'hémolysine, des fusions hly-lux ont été réalisées. Ici ce sont les fluctuations de la luminescence mesurée, rapportée au nombre de bactéries présentes, qui témoigne de la transcription de l'opéron *hly* ou bien de la traduction de son ARNm.

2.2.1. Cinétiques de 24 heures

Les cinétiques ont été effectuées en milieu riche, le LB, puis en milieu pauvre en fer, le M63 glycérol, dans lesquels l'effet de l'ajout de fer, avec 10 μM de FeCl_3 ou de chélateur, avec 100 μM de dipyrindyl, chélateur du fer, a été observé durant 24 heures avec des mesures de luminescence et de densité optique effectuées toutes les 15 minutes.

En LB, les souches ne montraient pas de phase de latence, la phase exponentielle était visible durant les neuf premières heures de croissances, un ralentissement est constaté après trois heures, mais la croissance reste soutenue. La phase stationnaire est donc observée après neuf heures de croissance, le plateau obtenu reste stable et ne montre pas de diminution de la masse de bactéries dans les puits. Toutes les souches montraient sensiblement la même croissance, quel que soit le milieu utilisé. Dans les trois milieux observés, les souches Δfur et $\Delta fur \Delta rylB$ montraient toutes les deux un retard de croissance, mais aussi un plateau légèrement moins élevé que les autres souches. Les courbes de croissances sont visibles en annexe, figures S8, S9 et S10.

Pour les fusions transcriptionnelles, le signal de la souche $\Delta fur \Delta rylB$ est toujours un peu plus faible que celui des autres souches. Tant que le milieu est riche en fer, figure 26, les autres souches : sauvage, Δfur et $\Delta rylB$ ont un signal assez similaire. L'ajout de fer supplémentaire, figure 27, n'induit pas de différence notable. Cependant, lorsque le chélateur est ajouté dans le milieu, figure 28, le signal de la souche sauvage est fortement augmenté, le pic passant de $3,5 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL à $5,5 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL. Chez les mutants Δfur , $\Delta rylB$ et $\Delta fur \Delta rylB$ il y a également une augmentation de signal, mais celle-ci n'est pas aussi forte. Pour le mutant Δfur le signal passe de $3,1 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL en LB à $4,1 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL, pour le mutant $\Delta rylB$ le signal passe de $3,3 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL à $4,2 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL et ce signal passe de $3,1 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL à $4,2 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL pour le mutant $\Delta fur \Delta rylB$.

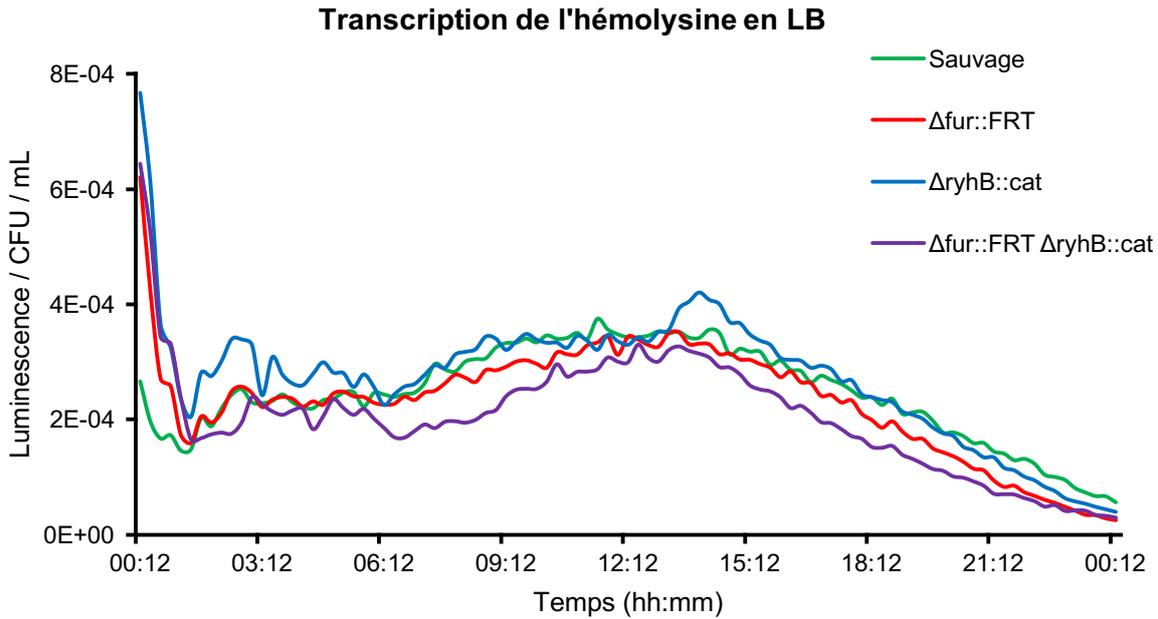


Figure 26. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

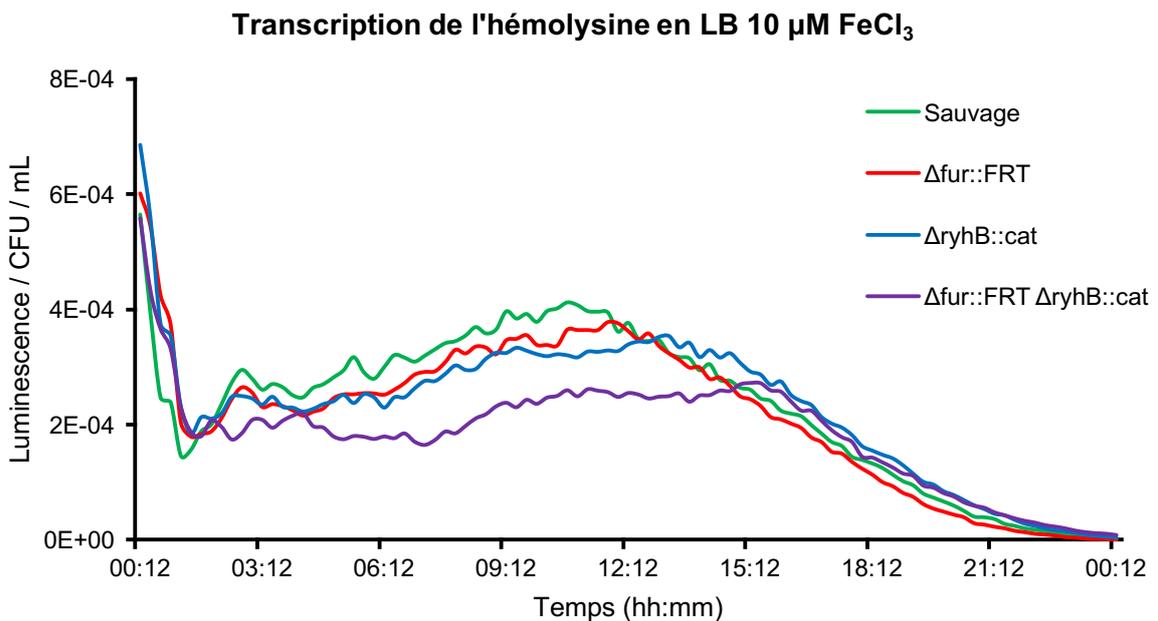


Figure 27. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de $FeCl_3$ lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

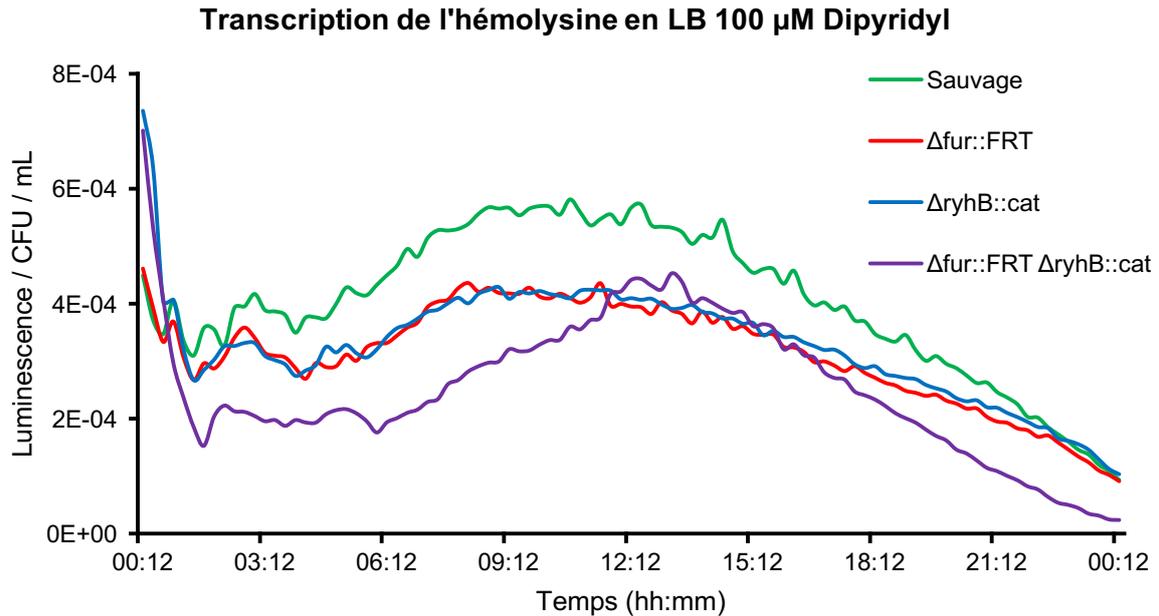


Figure 28. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 100 μ M de dipyrindyl lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

Pour les fusions traductionnelles, le signal obtenu montre très peu de variations pour chacune des souches quel que soit le milieu utilisé, et se stabilise en moins de trois heures, comme le montrent les figures 29 à 31. Cependant le signal du mutant $\Delta fur \Delta ryhB$ est toujours plus faible. En effet, entre 6 et 15 heures de croissance où le signal reste stable, le signal des souches sauvage, Δfur et $\Delta ryhB$ est compris entre $1,4 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL et $1,6 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL contre $0,65 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL à $0,85 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL, tous milieux confondus.

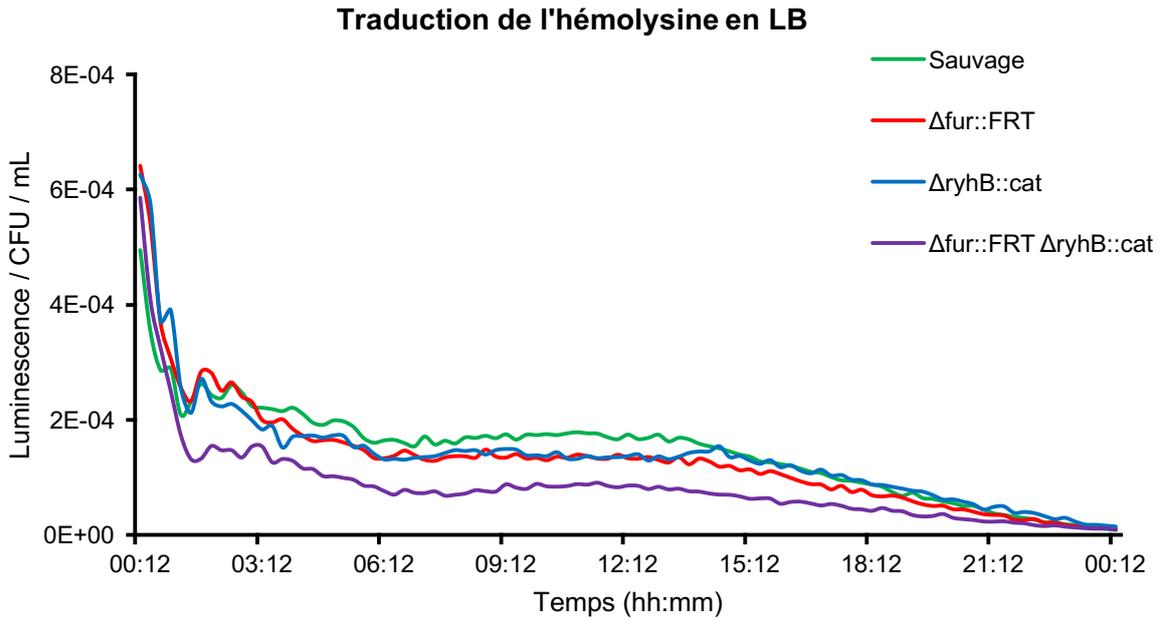


Figure 29. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

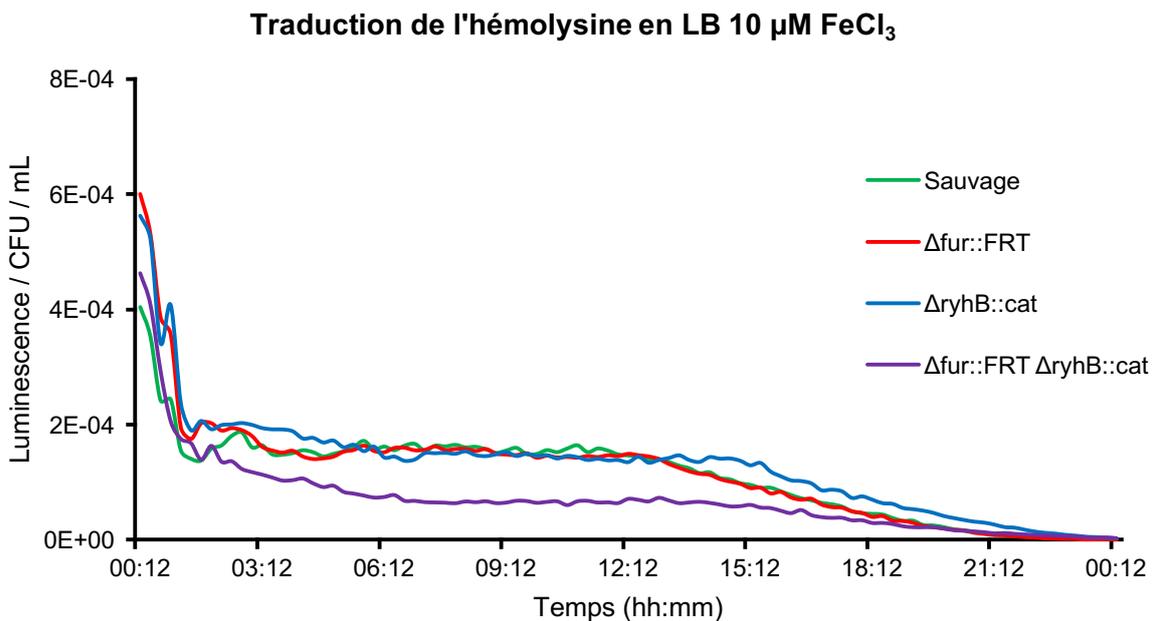


Figure 30. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de $FeCl_3$ lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

Traduction de l'hémolysine en LB 100 μ M Dipyrindyl

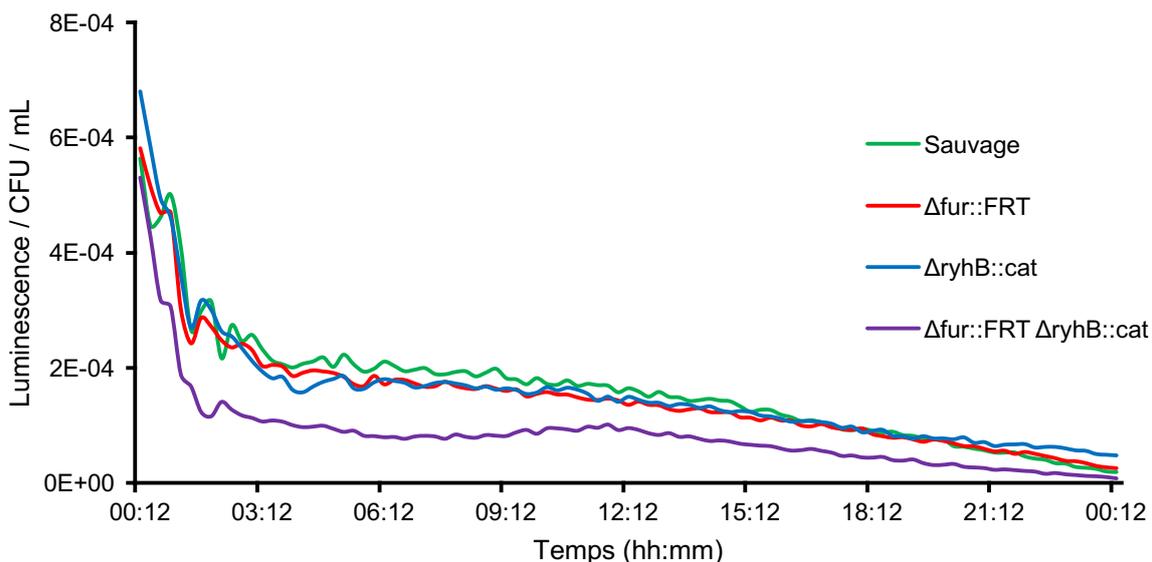


Figure 31. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 100 μ M de dipyrindyl lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

En M63 – glycérol, les souches présentent une phase de latence de quatre heures et 30 minutes environ, ce qui est logique vu qu'il s'agit d'un milieu pauvre en fer, la bactérie doit adapter son métabolisme à ce changement. Ensuite une phase de croissance exponentielle est observée de quatre heures et 30 minutes à 18 heures de croissance, ensuite la densité optique se stabilise puisque les bactéries entrent en phase stationnaire. Sans surprise, les souches présentaient toutes une meilleure croissance lorsque le milieu était supplémenté avec 10 μ M de $FeCl_3$ et leur croissance était légèrement réduite lorsque le milieu était encore plus appauvri en fer par l'ajout de 100 μ M de dipyrindyl. Enfin, le mutant $\Delta fur \Delta ryhB$ présentait toujours un léger retard par rapport aux autres souches, d'environ une heure au maximum. Les courbes de croissances sont disponibles en annexe, figures S11, S12 et S13.

Dans le cas des fusions transcriptionnelles, un décalage d'environ trois heures pour le signal du mutant $\Delta fur \Delta rylhB$ est constaté. Pour les souches sauvage, Δfur et $\Delta rylhB$, on constate que le schéma d'expression du signal est similaire si la souche est placée dans un milieu M63, figure 32, ou si le milieu est chélaté en fer, figure 34. Cependant, ce signal est fortement augmenté en présence de chélateur, en effet, pour les trois souches, le signal atteint un maximum d'environ $1,4 \cdot 10^{-3}$ unité de luminescence/CFU/mL dans le milieu M63 contre un d'environ $1,9 \cdot 10^{-3}$ unité de luminescence/CFU/mL pour le M63 chélaté en fer. L'ajout de fer quant à lui modifie peu le schéma du signal qui est également plus faible, figure 33. De plus, en présence de fer, lorsque les bactéries entrent en phase stationnaire, le signal de luminescence diminue peu à peu alors que le nombre de bactéries ne chute pas. Enfin, le signal du mutant $\Delta fur \Delta rylhB$ est similaire durant les neuf premières heures de croissance avant de chuter plus ou moins fortement, lorsque le milieu est chélaté en fer, le signal chute d'environ $1,5 \cdot 10^{-3}$ unité de luminescence/CFU/mL à $1,4 \cdot 10^{-3}$ unité de luminescence/CFU/mL, lorsque le milieu n'est pas supplémenté ni chélaté, le signal diminue jusqu'à $1,1 \cdot 10^{-3}$ unité de luminescence/CFU/mL, enfin, lorsque le milieu est supplémenté en fer, le signal chute diminué encore plus, jusqu'à $0,4 \cdot 10^{-3}$ unité de luminescence/CFU/mL.

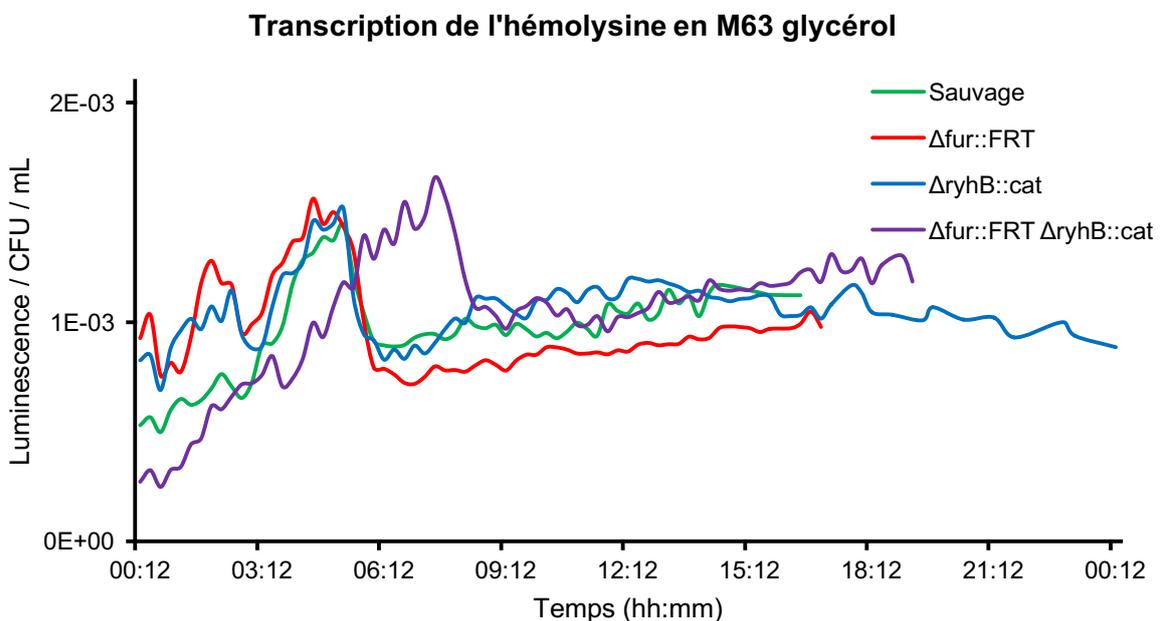


Figure 32. Transcription de l'hémolysine en milieu pauvre en fer lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta rylhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta rylhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

Transcription de l'hémolysine en M63 glycérol 10 μM FeCl_3

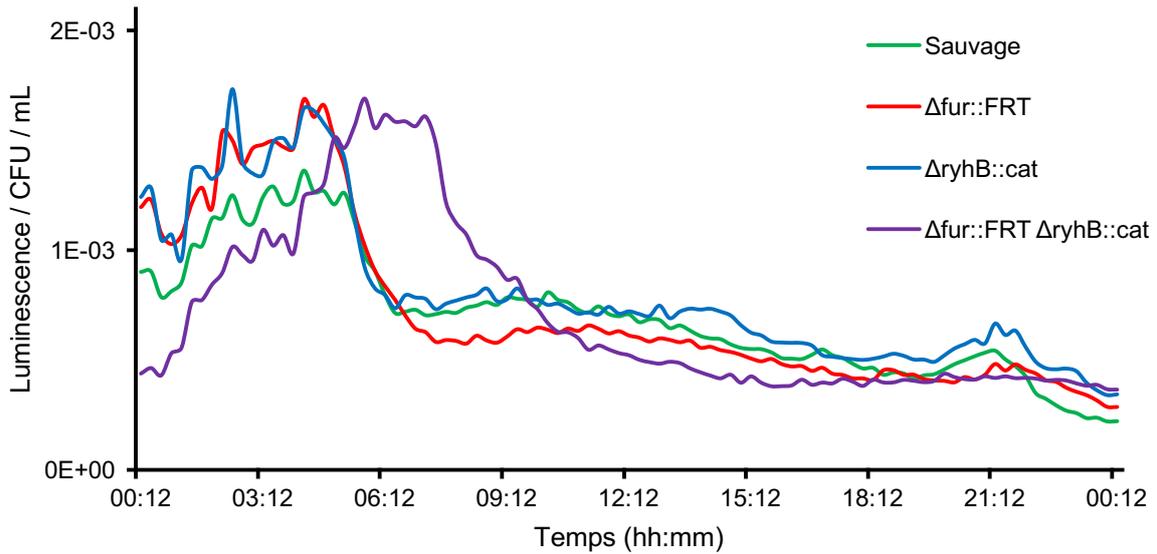


Figure 33. Transcription de l'hémolysine en milieu pauvre en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

Transcription de l'hémolysine en M63 glycérol 100 μM Dipyrindyl

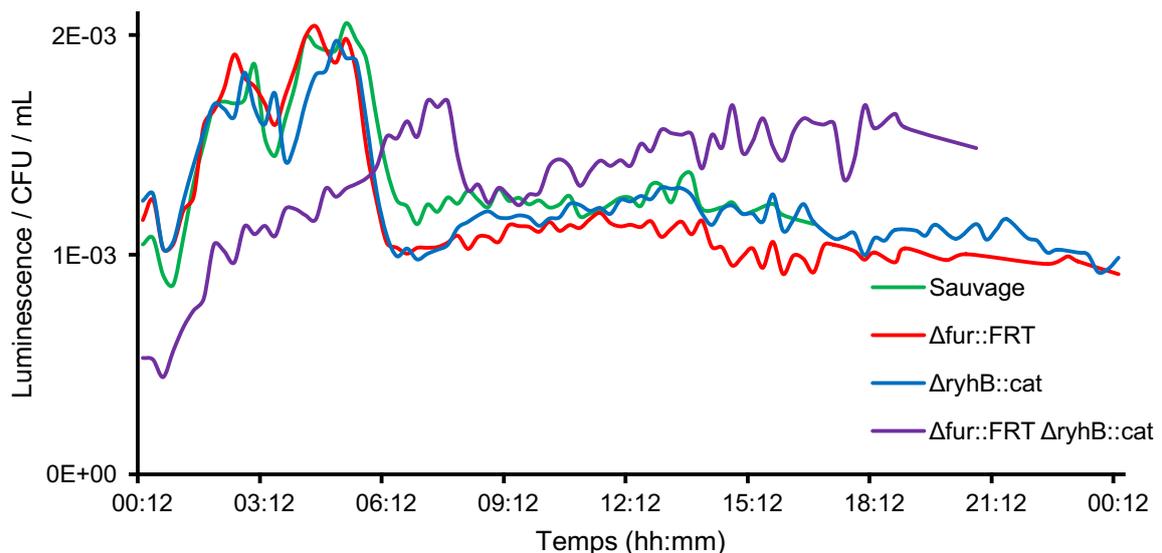


Figure 34. Transcription de l'hémolysine en milieu pauvre en fer chélaté par 100 μM de dipyrindyl lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

Enfin, pour les fusions traductionnelles, le signal du mutant $\Delta fur \Delta rylB$ est toujours plus faible que celui des autres souches, quel que soit le milieu. Aussi, une augmentation du signal est constatée chez la souche sauvage, $5,2 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL et le mutant Δfur , $4,7 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL, lorsque le milieu est chélaté en fer, figure 37, en comparaison avec le milieu M63 sans ajouts, figure 35, où le signal est de $3,4 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL et $3,9 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL, respectivement. Cette augmentation de signal disparaît dès que le gène *ryhB* est enlevé de la souche. L'ajout de fer dans le milieu, figure 36, ne génère pas de différence notable. De façon générale, le maximum de signal de la souche $\Delta fur \Delta rylB$, $3,3 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne pour les trois milieux, est plus faible que celui des souches sauvage, Δfur et $\Delta rylB$, $3,9 \cdot 10^{-4}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne pour les trois milieux.

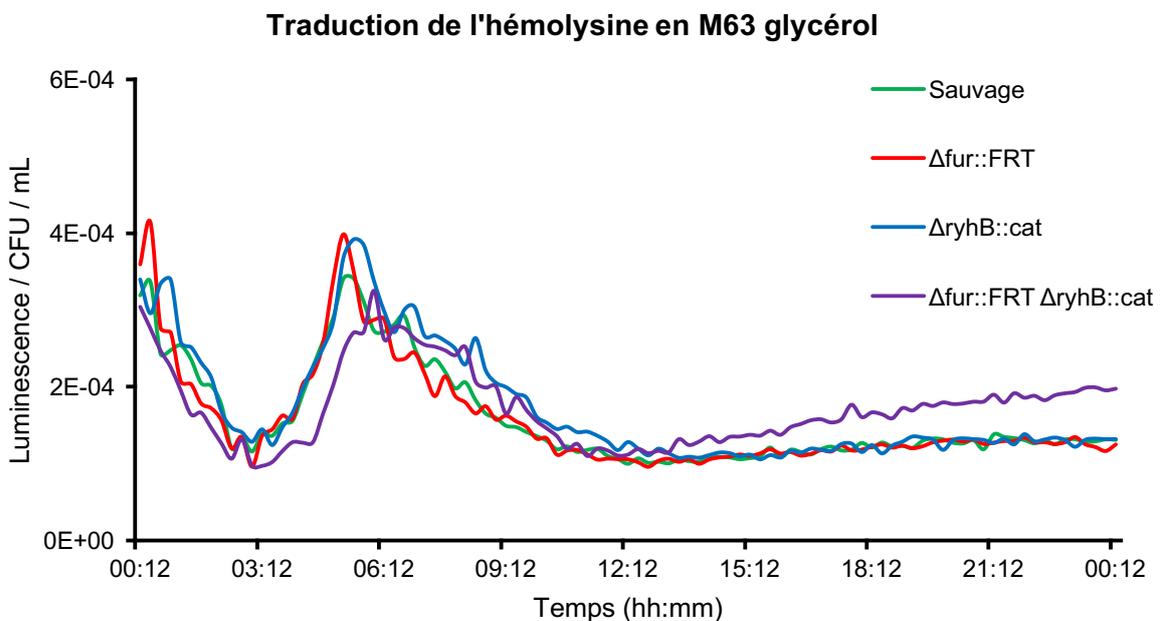


Figure 35. Traduction de l'hémolysine en milieu pauvre en fer lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta rylB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta rylB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

Traduction de l'hémolysine en M63 glycérol 10 μM FeCl_3

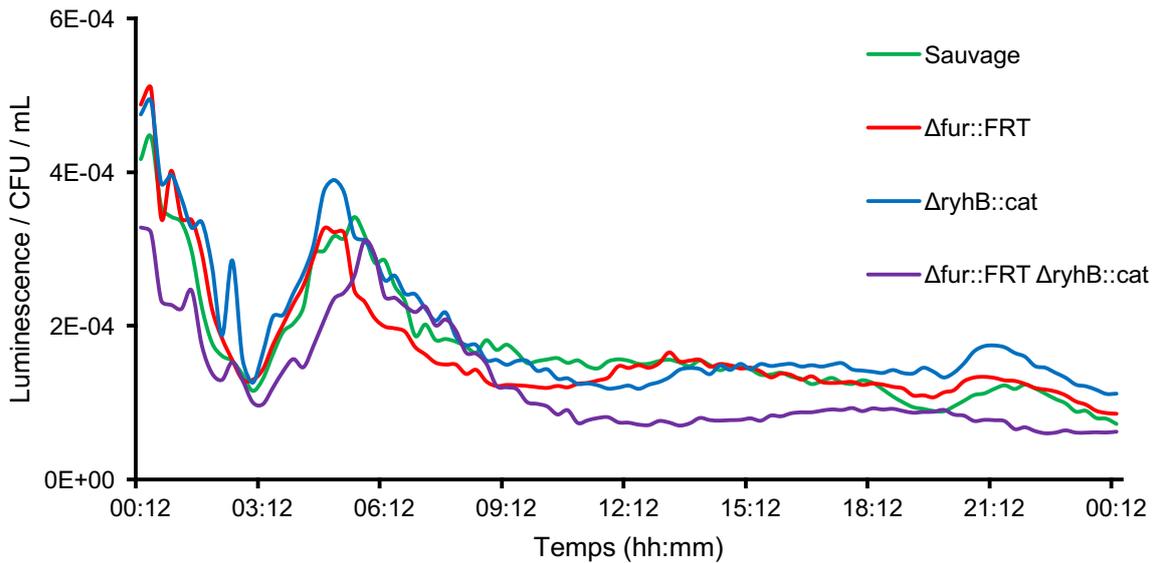


Figure 36. Traduction de l'hémolysine en milieu pauvre en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

Traduction de l'hémolysine en M63 glycérol 100 μM Dipyrindyl

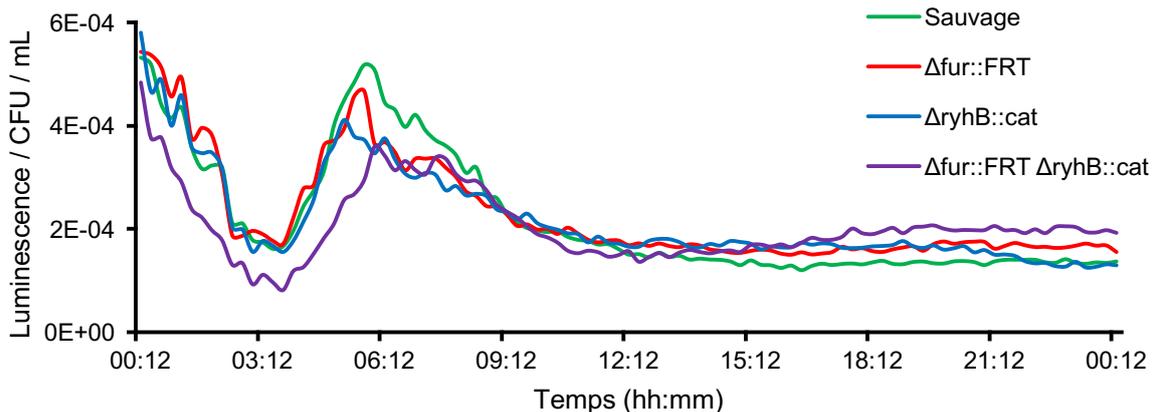


Figure 37. Traduction de l'hémolysine en milieu pauvre en fer chélaté par 100 μM de dipyrindyl lors d'une cinétique de 24 heures. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta fur::FRT$ en rouge, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec quatre réplicats.

2.2.2. Induction de la production de RyhB

Afin d'exagérer les phénotypes observés durant les cinétiques de 24 heures, des cinétiques d'une heure ont été réalisées en induisant fortement la production de RyhB en milieu riche, LB, avec 0,1 % d'arabinose, ou bien en la réprimant avec 0,2 % de glucose, enrichi avec 10 μM de FeCl_3 , ou chélaté par 200 μM de dipyridyl.

Pour les souches contenant la fusion transcriptionnelle, l'induction de la transcription de RyhB dans le milieu chélaté en fer, figure 38, montre une augmentation du signal de luminescence pour toutes les souches. L'induction de la transcription de RyhB dans le milieu supplémenté en fer, figure 39, ne montre aucune augmentation de signal. Lorsque la transcription de RyhB est réprimée dans le milieu chélaté en fer, figure 40, aucune variation de signal n'est observée. Cette répression dans le milieu supplémenté, figure 41, ne montre aucune variation de signal pour les souches ΔaraBAD ou $\Delta\text{araBAD} \Delta\text{ryhB}$, mais pour la souche $\Delta\text{araBAD} \Delta\text{fur} \Delta\text{ryhB}$, le signal est plus fort, $9,1 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL durant les 20 premières minutes puis revient à un niveau proche de celui de cette même souche contenant le plasmide vide, $5,5 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL.

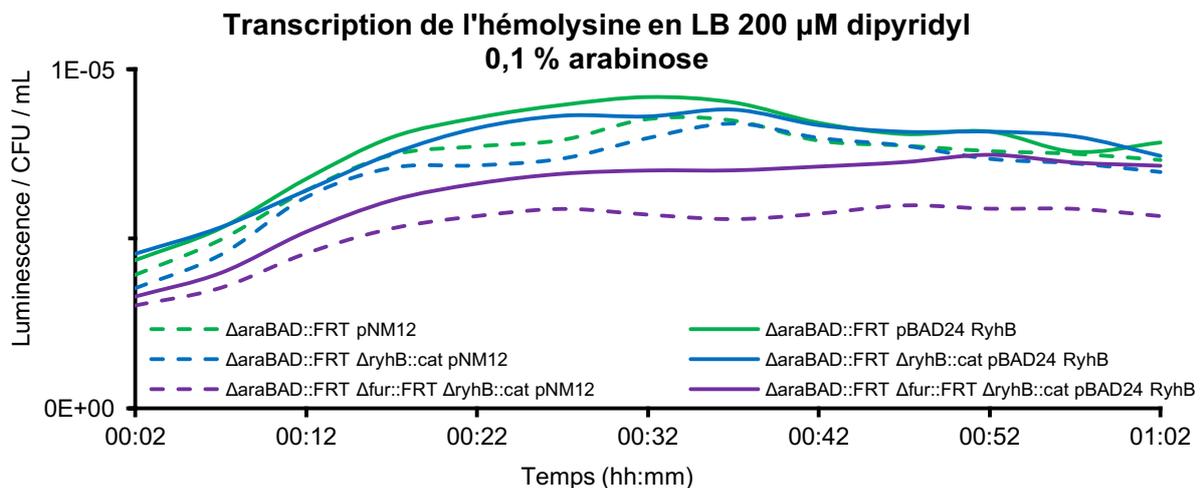


Figure 38. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μM de dipyridyl où l'expression de *ryhB* est induite par 0,1 % d'arabinose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ en bleu et $\Delta\text{fur}::\text{FRT } \Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

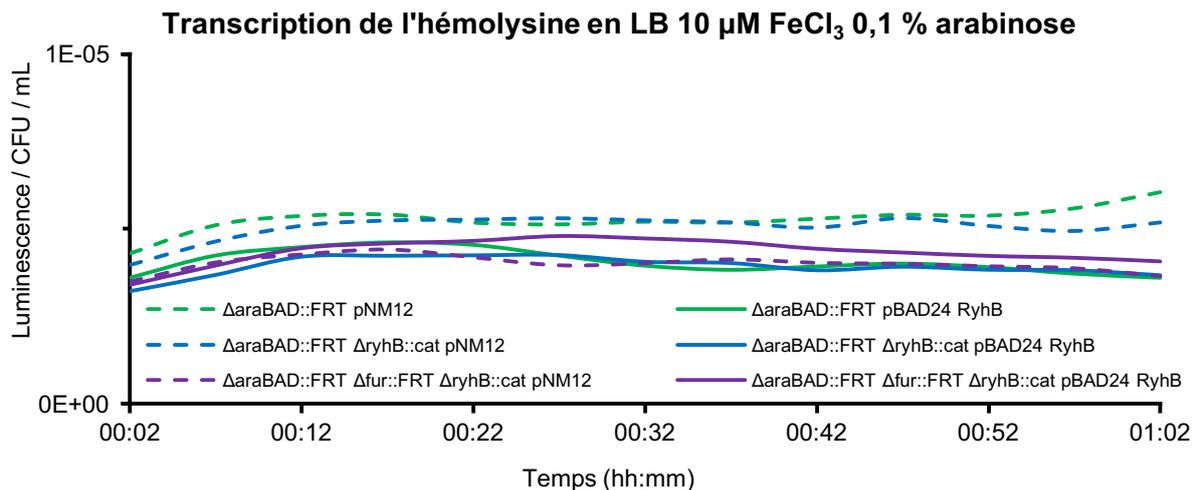


Figure 39. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 où l'expression de *ryhB* est induite par 0,1 % d'arabinose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

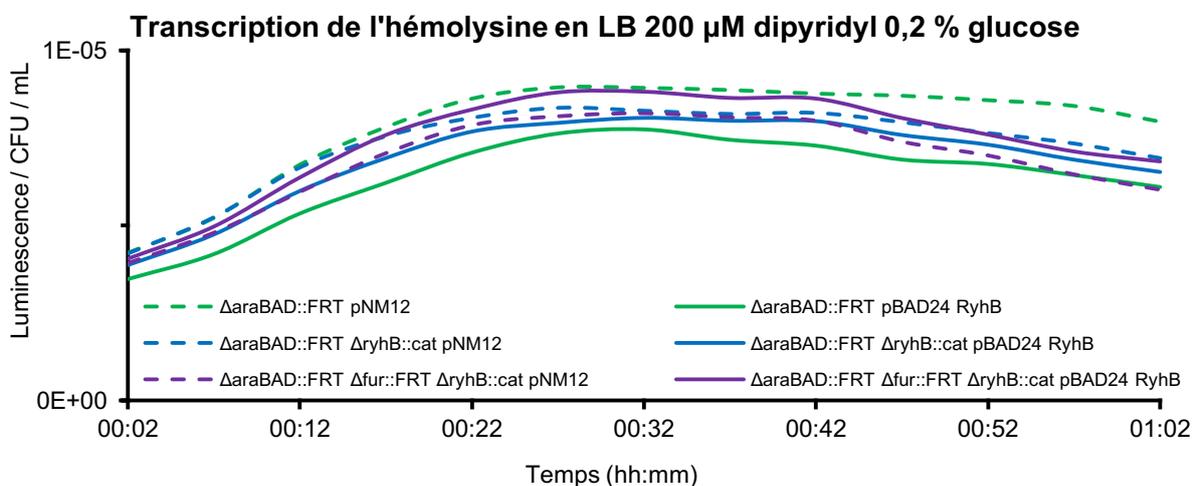


Figure 40. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μM de dipyrindyl où l'expression de *ryhB* est réprimée par 0,2 % de glucose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta ryhB::cat$ en bleu et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

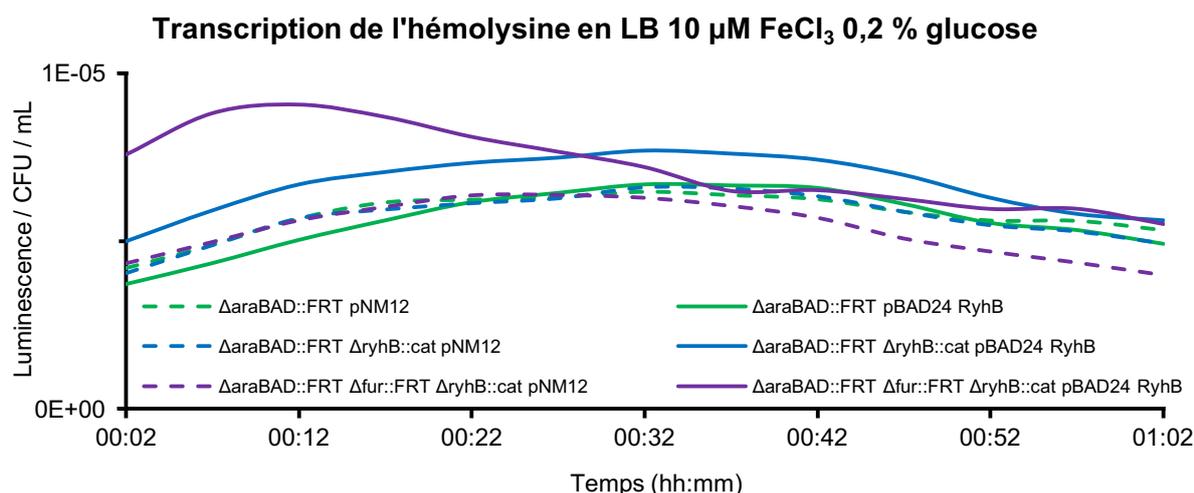


Figure 41. Transcription de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μ M de FeCl₃ où l'expression de *ryhB* est réprimée par 0,2 % de glucose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, *ΔryhB::cat* en bleu et *Δfur::FRT ΔryhB::cat* en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La de luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

Pour les souches contenant la fusion traductionnelle, l'induction de la production de RyhB en milieu déplété en fer, figure 42, montre une diminution du signal chez la souche *ΔaraBAD*, de $7,5 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL à $4,5 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne, une augmentation du signal pour la souche *ΔaraBAD ΔryhB*, de $1,6 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL à $6,7 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne, et la souche *ΔaraBAD Δfur ΔryhB* ne montre pas de variation de signal. L'induction de la transcription de RyhB dans le milieu supplémenté en fer, figure 43, induit une diminution du signal de luminescence chez les souches *ΔaraBAD*, de $3,4 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL à $2,8 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne, et *ΔaraBAD Δfur ΔryhB*, de $2 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL à $1,6 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne, mais une augmentation de signal pour la souche *ΔaraBAD ΔryhB*, de $0,7 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL à $3,7 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne. Ensuite, la répression de la transcription de RyhB dans le milieu chélaté en fer, figure 44, ne montre pas de grandes variations de signal chez les souches *ΔaraBAD* et *ΔaraBAD Δfur ΔryhB*, mais la souche *ΔaraBAD ΔryhB* montre une forte augmentation de signal, de $1,1 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL à $6 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne. Enfin, la répression de la production de RyhB dans le milieu supplémenté, figure 45, change très peu le signal de luminescence pour les souches *ΔaraBAD* et *ΔaraBAD Δfur ΔryhB*, mais la souche *ΔaraBAD ΔryhB* montre ici aussi une augmentation de signal de $6,2 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL à $5,2 \cdot 10^{-6}$ unité de luminescence/CFU/mL en moyenne.

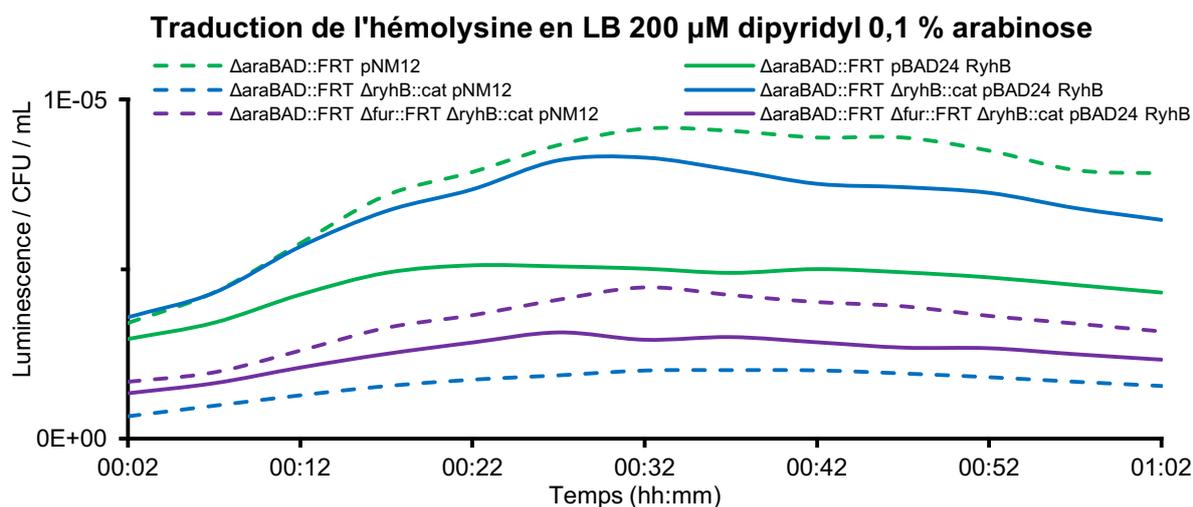


Figure 42. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μ M de dipyridyl où l'expression de *ryhB* est induite par 0,1 % d'arabinose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, Δ *ryhB*::*cat* en bleu et Δ *fur*::FRT Δ *ryhB*::*cat* en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

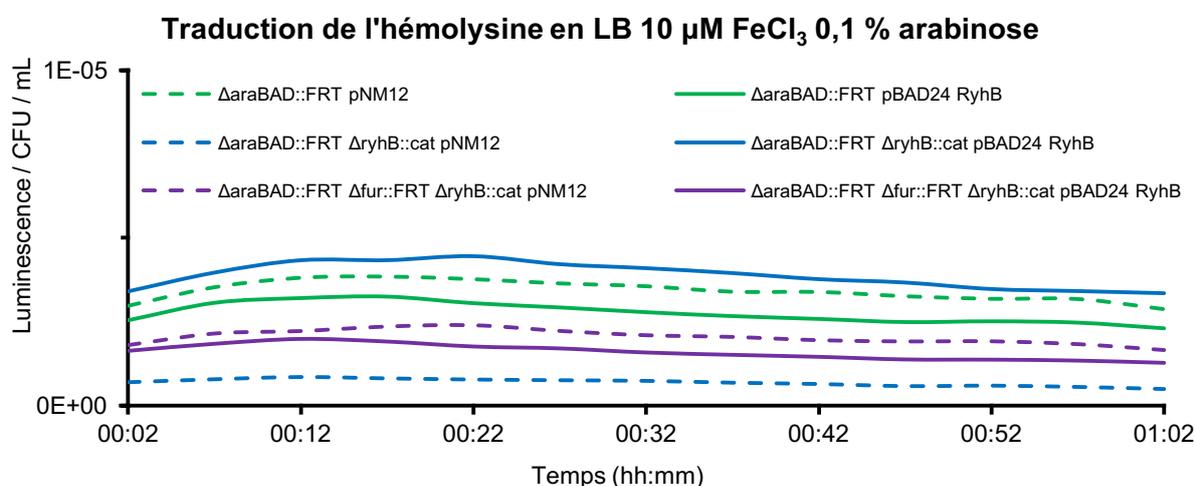


Figure 43. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μ M de FeCl₃ où l'expression de *ryhB* est induite par 0,1 % d'arabinose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, Δ *ryhB*::*cat* en bleu et Δ *fur*::FRT Δ *ryhB*::*cat* en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

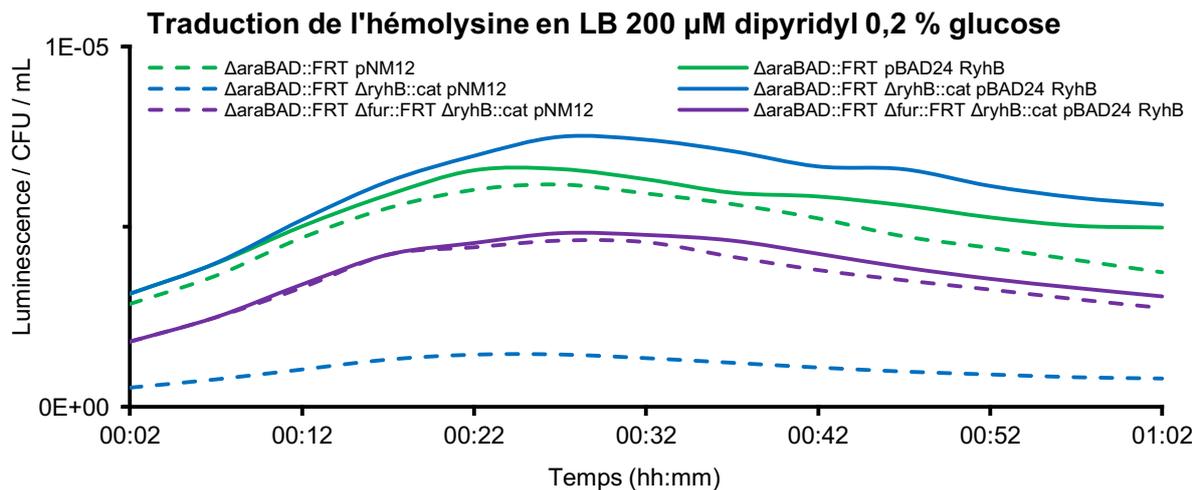


Figure 44. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer chélaté par 200 μM de dipyrindyl où l'expression de *ryhB* est réprimée par 0,2 % de glucose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ en bleu et $\Delta\text{fur}::\text{FRT } \Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

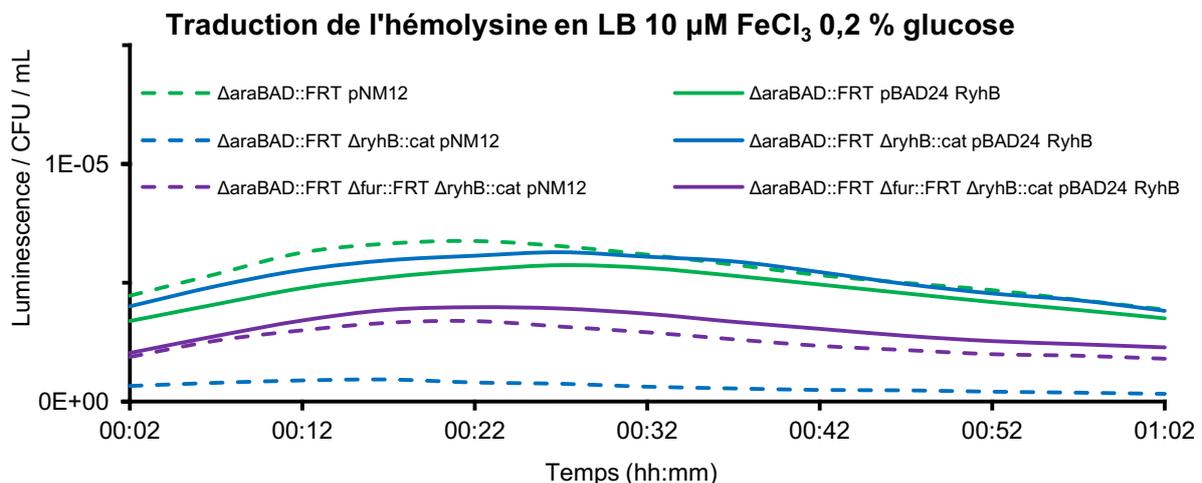


Figure 45. Traduction de l'hémolysine en milieu riche en fer supplémenté par 10 μM de FeCl_3 où l'expression de *ryhB* est réprimée par 0,2 % de glucose. Les ordonnées représentent le signal de luminescence / CFU / mL afin de s'émanciper de l'effet de la croissance sur la production de l'hémolysine. La souche sauvage est représentée en vert, $\Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ en bleu et $\Delta\text{fur}::\text{FRT } \Delta\text{ryhB}::\text{cat}$ en violet. Les courbes en pointillés représentent le plasmide vide et les courbes en trait plein représentent le plasmide contenant *ryhB*. La luminescence et la densité optique à 600 nm ont été mesurées toutes les 15 minutes. Chaque courbe représente la moyenne d'une expérience effectuée une fois avec trois réplicats.

DISCUSSION

Le but de cette étude était de comprendre la régulation de l'expression de l'hémolysine par l'homéostasie du fer, via Fur et RyhB. En effet, l'hémolysine est un facteur de virulence connu pour être impliqué dans les infections du tractus urinaire (Cooke *et al.*, 1975, Wiles *et al.*, 2013). C'est pourquoi la compréhension de sa régulation pourrait non seulement permettre de mieux comprendre la pathogenèse des UPEC, mais aussi offre une possibilité de déréguler la production de la toxine par le pathogène. Ceci induirait une diminution de sa virulence, constituant une méthode de traiter les infections urinaires sans utiliser d'antibiotiques, permettant de contourner le problème de l'émergence de la résistance aux antibiotiques par les souches pathogènes.

Dans ce contexte, certaines données sont déjà connues. En premier lieu, Fur et RyhB sont les régulateurs principaux de l'homéostasie du fer chez *E. coli* (Andrews *et al.*, 2003, Gottesman, 2004, Litwin *et al.*, 1993, Touati, 2000). Ensuite, il est également connu que de faibles concentrations en fer dans l'environnement de la bactérie constituent un signal d'induction des facteurs de virulence (Litwin *et al.*, 1993). De plus, un des rôles de cette toxine est, par ailleurs, de lyser les cellules de l'hôte pour libérer les nutriments qu'ils contiennent afin que la bactérie puisse les acquérir et surtout les utiliser dans son propre métabolisme (Keane *et al.*, 1987, Wiles *et al.*, 2008b). Il est donc possible que lorsque la bactérie rencontre un environnement avec de faibles concentrations en fer, celles-ci induisent la production de l'hémolysine qui pourra lyser les cellules de l'hôte, libérant ainsi le fer pour les besoins de la bactérie. Si tel est le cas, l'homéostasie du fer pourrait être un régulateur de l'expression de la toxine via les régulateurs Fur et RyhB. Cependant, les données de régulation de l'hémolysine sont peu connues et plusieurs mécanismes de régulation par Fur et RyhB existent (Porcheron *et al.*, 2015). Premièrement, il était nécessaire de démontrer un lien entre Fur, RyhB et l'hémolysine, puis de comprendre quel est le mécanisme de régulation mis en jeu.

Tout d'abord, les phénotypes hémolytiques, gouttes de 10 μ L, figure 21, et colonies isolées, figure 22, montraient une diminution, bien que faible, de la lyse d'érythrocytes chez les souches mutantes *fur* négatives. Ceci implique que Fur contribue à l'expression de l'hémolysine. Un mécanisme possible pour cela étant qu'en absence de Fur, le sRNA RyhB est surexprimé et empêche la traduction de l'hémolysine, soit par dégradation de son ARNm ou juste en empêchant la liaison des ribosomes. C'est un mécanisme très commun de RyhB pour lequel de très nombreuses cibles ont déjà été identifiées (Masse *et al.*, 2005).

Aussi, les surnageants de culture n'ont jamais montré de lyse, contrairement à de nombreuses autres études avec d'autres souches (Benz *et al.*, 1989, Boehm *et al.*, 1990a, Dobereiner *et al.*, 1996, Eberspacher *et al.*, 1989, Gadeberg *et al.*, 1983, Jorgensen *et al.*, 1983, Keane *et al.*, 1987, Skals *et al.*, 2009, Uhlen *et al.*, 2000). Toutes ces études filtraient le surnageant en utilisant un filtre avec des pores plus gros, il est donc possible que les filtres utilisés aient retenu l'hémolysine. De plus, nombre d'entre-elles concentraient l'hémolysine après avoir filtré le surnageant, il est possible que ce soit une étape nécessaire pour le surnageant de la souche CFT073.

Les tests phénotypiques, figures 23 à 25, amenaient donc à penser à un rôle de RyhB dans la dégradation de l'ARNm de l'hémolysine. Cependant, le retard de croissance constaté chez les mutants Δfur et $\Delta fur \Delta rhyB$, montré en figure S14 dans les annexes, peut aussi bien être à l'origine de ces différences de phénotypes observées. Ces résultats démontrent donc un lien entre les régulateurs Fur et RyhB et la production d'hémolysine par la bactérie. Mais ils ne permettent pas de comprendre de mécanisme de régulation impliqué.

C'est pourquoi la suite des manipulations s'est concentrée sur la production de l'hémolysine au niveau transcriptionnel et traductionnel, par des fusions à l'opéron *lac* et l'opéron *lux*. Ces fusions montrent tout d'abord que la transcription de l'hémolysine a lieu lors des premières heures de croissance de CFT073, en phase de latence, alors que la traduction a lieu durant la phase exponentielle de croissance, comme montré en figures 26. La production de l'hémolysine est plus visible en M63, un milieu pauvre en fer, ce qui est cohérent avec l'idée que l'hémolysine sert à lyser les cellules pour que la bactérie récupère les nutriments libérés.

Les fusion transcriptionnelles *Phly::lac* et *PhlyCA::lac* montrent que la perte de Fur et RyhB permet une meilleure expression de l'hémolysine. Ceci peut amener à penser que la suppression de Fur conduit à une surexpression de RyhB qui se lierait à l'ARNm produit et induire la dégradation du complexe ainsi formé. Ici, RyhB semblerait donc empêcher la traduction de l'hémolysine. En effet, cette hypothèse est supportée par les figures 24 et 25 qui montrent, en phase de latence, une augmentation de la production d'hémolysine chez le double mutant. De plus, la figure 25 montre également une baisse de signal pour le mutant Δfur . Cependant certains résultats ne concordent pas avec cette analyse, par exemple, en figure 24, le signal du mutant Δfur est cette fois-ci augmenté et dans la figure 25, le signal du mutant $\Delta rhyB$ est similaire à celui de la souche sauvage. La méthode employée pour mesurer l'activité de la β galactosidase peut manquer de précision lorsque qu'un grand nombre d'échantillons est mesuré, ce qui transparait au niveau de certains écarts types, qui sont assez importants. Enfin, la différence de niveau d'expression entre les deux fusions peut être expliquée par le fait que l'ARNm est plus grand, donc plus long à dégrader par la bactérie, laissant alors plus de temps à la traduction du message.

Dans le cadre des fusions traductionnelles *PhlyC::lac* et *PhlyCA::lac*, la figure 26 montre que l'absence de RyhB réduit l'expression de l'hémolysine. En effet, l'expression de la souche $\Delta lac \Delta fur \Delta ryhB$ est significativement diminuée par rapport à celle de la souche $\Delta lac \Delta fur$. Dans la souche $\Delta lac \Delta fur$ où RyhB est surexprimé, le signal est plus élevé que dans la souche $\Delta lac \Delta ryhB$. Cependant, les résultats présentés en figure 27 ont des écarts types trop élevés pour des variations d'expression de l'hémolysine significativement différentes.

Les résultats contradictoires obtenus avec les fusions *lac* transcriptionnelles par rapport aux fusions traductionnelles à ce même opéron peuvent être expliqués par plusieurs raisons. Tout d'abord, il est possible que la région d'ADN servant de promoteur soit trop courte, en effet il a été démontré que la séquence JUMPstart, située environ 300 paires de bases avant le gène *hlyC*, améliorerait la transcription de l'hémolysine en association avec RfaH (Leeds *et al.*, 1997). Cependant, cette séquence n'est pas entièrement retrouvée dans les séquences utilisées pour les fusions avec l'opéron *lac*. Aussi, les plasmides utilisés sont des plasmides multicopies, il est donc possible que la régulation soit moins efficace. Enfin, l'absence d'intégration des fusions peut aussi en modifier la régulation.

Par conséquent, pour les fusions à l'opéron *lux*, une région d'ADN plus grande, comprenant toute la région JUMPstart, a été utilisée et les fusions ont été intégrées dans le génome de CFT073. Aussi, les mesures ont été faites en cinétiques, pour suivre l'évolution de la production de l'hémolysine sur de plus longues durées. La luminescence, ainsi que la densité optique, ont été mesurées de façon automatisée, ce qui permet plus de précision que lors des mesures de l'activité de la β galactosidase. Les variations de production de l'hémolysine ont été étudiées en milieu riche en fer, le LB, et en milieu pauvre en fer, le M63 glycérol, via les variations de luminescence générées par chaque mutant en différentes conditions.

Concernant la fusion transcriptionnelle, dont les résultats sont résumés en figure 46, le mutant $\Delta fur \Delta rylB$ a toujours une plus faible expression de l'hémolysine dans le milieu riche en fer, figure 26. Comme attendu, quand ce milieu est supplémenté en fer, figure 27, aucune des souches ne montre d'élévation de son niveau d'expression de l'hémolysine. Lorsque le milieu est chélaté en fer, figure 28, une forte hausse du signal est observée chez la souche sauvage, cette augmentation est plus faible chez les mutants. Ces mêmes mutants, lorsqu'ils sont placés dans un milieu pauvre en fer, figure 32, ont un schéma d'expression un peu différent. En effet, le niveau d'expression générale de la souche $\Delta fur \Delta rylB$ n'est pas diminué, mais le signal est retardé d'environ 3 heures dans chacune des conditions testées. De la même façon qu'en LB, l'ajout de dipyridyl, figure 34, induit une forte augmentation de signal pour la souche sauvage et une augmentation un peu moins marquée pour les souches Δfur et $\Delta rylB$. L'ajout de fer dans ce milieu, figure 33, induit une diminution du signal de luminescence à partir du moment correspondant au début de la phase exponentielle de croissance, dont les courbes sont visibles en annexes, figures S1 à S6. Ces résultats indiquent que Fur et/ou RylB semblent nécessaires pour l'expression correcte de l'hémolysine, et la régulation de cette expression lorsque la bactérie se trouve confrontée à des variations dans la concentration en fer.

Résumé des cinétiques de transcription de l'hémolysine

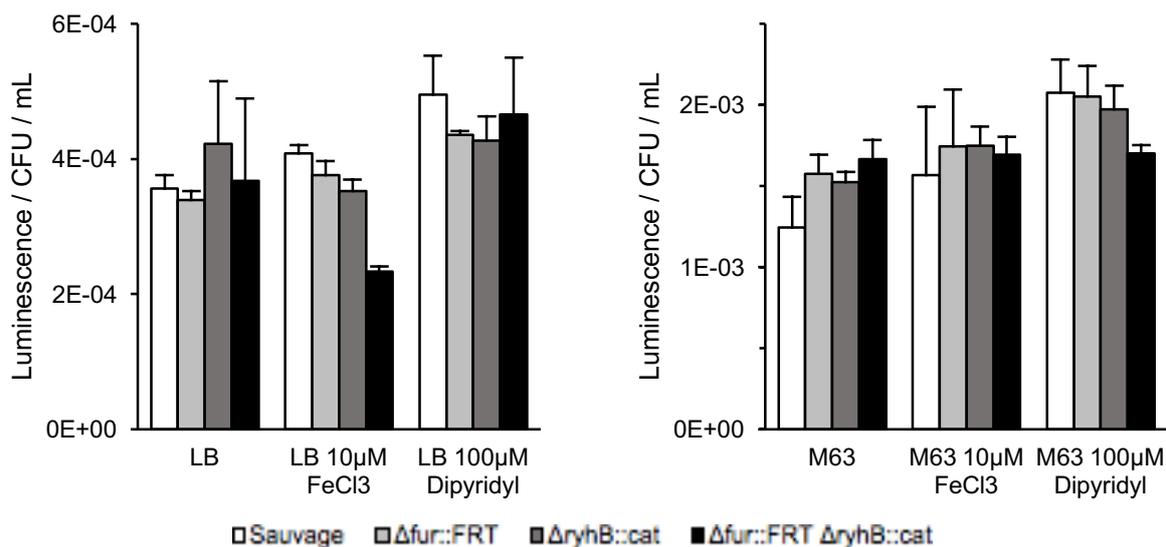


Figure 46. Résumé des cinétiques de transcription de l'hémolysine. Les données proviennent directement des cinétiques présentées en résultats, figures 26 à 28 et 32 à 34. Chaque colonne représente la moyenne des trois ou quatre réplicats correspondants au maximum observé et les barres d'erreur représentent les écart types.

Ensuite, comme pour la fusion traductionnelle, dont les résultats sont résumés en figure 47, le mutant $\Delta fur \Delta ryhB$ montre toujours un signal plus faible que celui des autres souches. Le signal de traduction chute très rapidement et se stabilise à un niveau faible, possiblement parce que les niveaux de fer sont suffisants pour les besoins de la bactérie. Cependant, en milieu pauvre en fer, figure 35, l'expression de l'hémolysine est différente. Le signal de la souche $\Delta fur \Delta ryhB$ montre un retard d'environ une heure tout en restant approximativement au même niveau que celui des autres mutants. La chélation du fer par le dipyridyl, figure 37, induit une augmentation du signal de luminescence chez la souche sauvage et le mutant Δfur , mais pas chez les mutants $\Delta ryhB$ et $\Delta fur \Delta ryhB$. Ceci semble indiquer un rôle pour RyhB dans l'expression de l'hémolysine.

Résumé des cinétiques de traduction de l'hémolysine

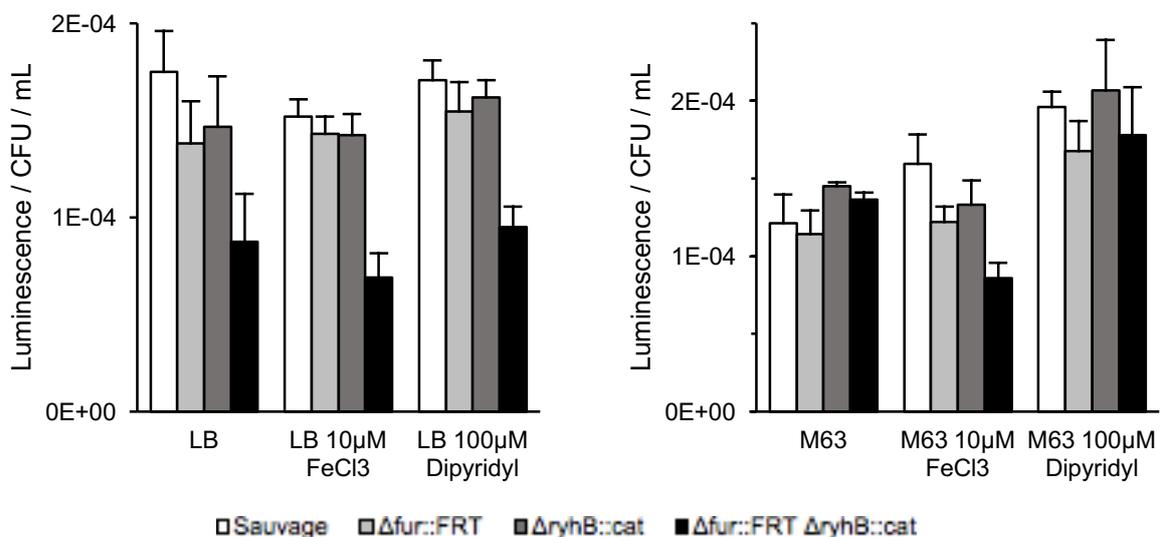


Figure 47. Résumé des cinétiques de traduction de l'hémolysine. Les données proviennent directement des cinétiques présentées en résultats, figures 29 à 31 et 35 à 37, Chaque colonne représente la moyenne des trois ou quatre réplicats correspondants au milieu du plateau observé et les barres d'erreur représentent les écart types.

Aussi, des cinétiques d'une heure ont été effectuées en LB après ajout de vecteurs inductibles à l'arabinose contenant le gène codant pour RyhB, ou bien vides, aux mutants possédant les deux fusions *lux*.

Pour la fusion transcriptionnelle, dont les résultats sont résumés en figure 48, chaque souche montre une augmentation d'expression de l'hémolysine lorsque *ryhB* est induit par l'arabinose dans le milieu chélaté en fer, figure 38. Ceci va dans le sens d'une activation de la traduction du transcrit par RyhB. Toujours dans le milieu chélaté en fer, la répression de l'expression de RyhB par le glucose, figure 40, ne montre que très peu de modifications du signal de luminescence, donc de la production d'hémolysine. Lorsque du fer est ajouté dans le milieu, figures 39 et 41, les souches $\Delta araBAD$ et $\Delta ryhB$ ne montrent pas de différence dans leur signal puisque la présence de Fur régule l'expression de l'hémolysine. Les principaux effets de la régulation de Fur et RyhB sur la production d'hémolysine se voient surtout en LB chélaté en fer où l'arabinose induit l'expression de RyhB, les autres conditions servant plutôt de contrôle.

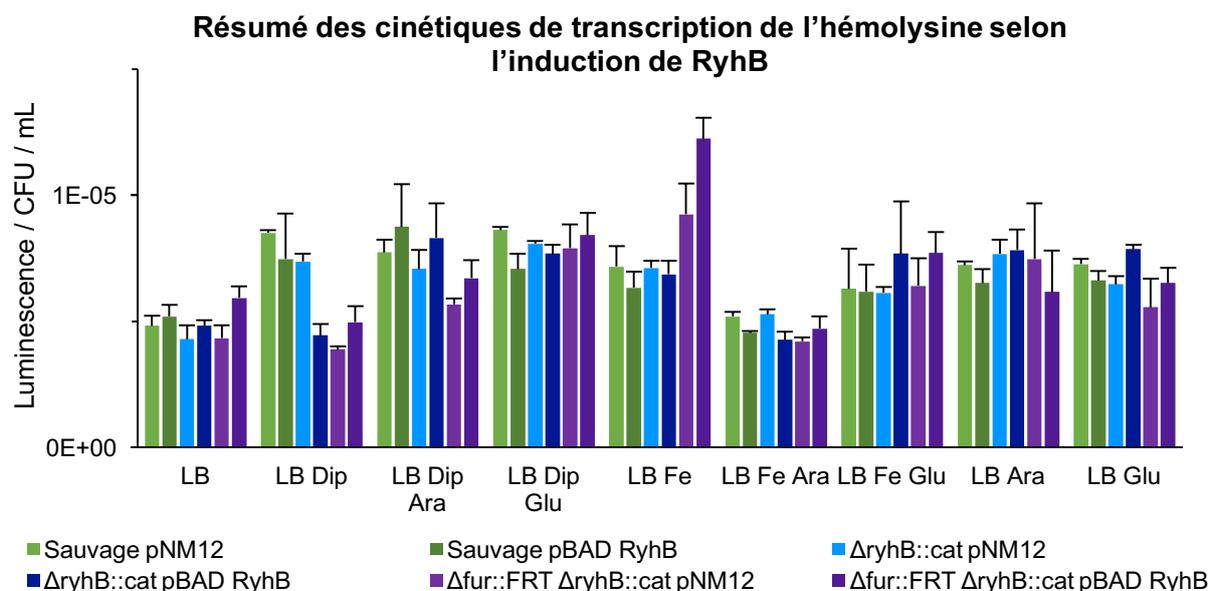


Figure 48. Résumé des cinétiques de transcription de l'hémolysine selon l'induction de *ryhB*. Les données proviennent directement des cinétiques présentées en résultats, figures 38 à 41. Chaque colonne représente la moyenne des trois réplicats à 22 minutes et les barres d'erreurs correspondent aux écart types.

Pour les mutants contenant la fusion traductionnelle et le plasmide inducible, dont les résultats sont résumés en figure 49, l'ajout d'arabinose dans le milieu chélaté en fer, figure 42, induit une diminution du signal pour la souche sauvage, possiblement due à une trop grande production de RyhB, natif et cloné. Lorsque le milieu est enrichi en fer, figures 43 et 45, la souche sauvage et le mutant $\Delta araBAD \Delta fur$ montrent peu de variations de signal, ce qui est attendu dans la mesure où les niveaux en fer sont suffisants pour le bon fonctionnement du métabolisme bactérien. Aussi, peu importe les conditions, le mutant $\Delta ryhB$ avec le vecteur inducible contenant *ryhB* montre toujours une forte augmentation de la production de l'hémolysine. Il est possible que les clonages dans le plasmide aient modifié sa sensibilité à la répression par le glucose. Enfin, dans toutes les conditions testées, le mutant $\Delta araBAD \Delta fur \Delta ryhB$ montre très peu de modifications dans la production de l'hémolysine, ce qui laisse penser qu'en l'absence de Fur et RyhB l'expression de la toxine n'est pas régulée.

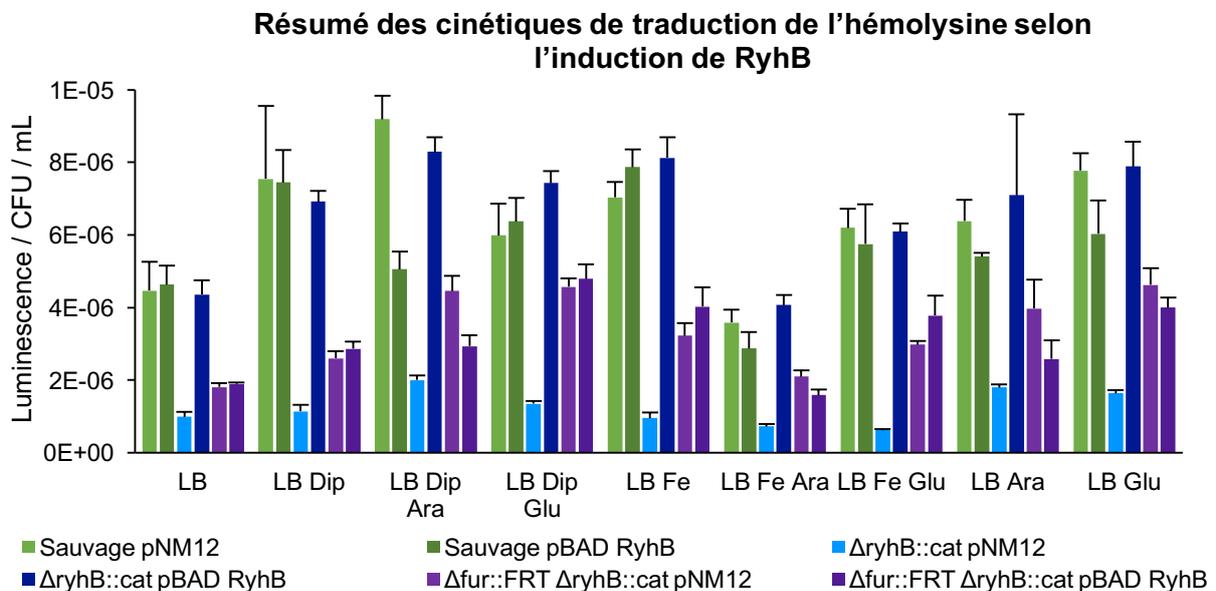


Figure 49. Résumé des cinétiques de traduction de l'hémolysine selon l'induction de *ryhB*. Les données proviennent directement des cinétiques présentées en résultats, figures 42 à 45. Chaque colonne représente la moyenne des trois réplicats à 22 minutes et les barres d'erreurs correspondent aux écarts types.

Finalement, différentes analyses *in silico* ont été effectuées pour déterminer un site de liaison possible de RyhB sur le transcrite de l'hémolysine. Cependant, ces différentes analyses ont donné des résultats très différents, voire contradictoires. C'est pour cette raison que les prochaines expériences envisagées ont pour but de définir expérimentalement ce site de liaison.

CONCLUSION

L'hémolysine est un facteur de virulence important dans le cadre des infections urinaires. Son rôle, via la lyse des cellules de l'hôte, est de fournir des nutriments, et surtout du fer, à la bactérie. Cependant cette lyse de cellules est délétère pour l'hôte puis qu'elle peut induire des dommages irrémediables, notamment dans les reins. Comprendre la régulation de l'hémolysine est donc important pour limiter ces dommages et permettre aussi d'atténuer la virulence des souches pathogènes, contournant ainsi le problème d'émergence de résistances aux antibiotiques et possiblement aussi de récurrences.

Les résultats obtenus amènent à penser que RyhB a un rôle dans l'activation de la traduction de l'ARNm de l'hémolysine. Ce mécanisme est peu connu et n'a été décrit que pour *shiA*, qui code pour une perméase pour le shikimate, impliqué dans la synthèse des sidérophores. D'autres gènes sont régulés positivement par RyhB, par exemple *ftnA* qui code pour la protéine de stockage du fer ferritine (Prevost *et al.*, 2007). En prenant en considération le rôle de l'hémolysine dans l'acquisition du fer par le pathogène, un possible rôle de RyhB dans la régulation positive de l'expression de cette toxine est tout à fait compatible.

D'autres expériences sont nécessaires pour confirmer ce rôle de stabilisation de l'ARNm de l'hémolysine par RyhB. Refaire les expériences d'induction de l'expression de RyhB en milieu pauvre en fer, le M63 glycérol, pourrait permettre de mieux constater l'effet de RyhB dans la régulation de l'hémolysine. Ensuite, effectuer des tests d'immunodétection, Western blot, donnerait un moyen d'observer les effets de cette régulation sur le niveau de production de l'hémolysine sécrétée. Enfin, la meilleure façon de prouver la régulation directe de l'hémolysine par RyhB serait de trouver son site de liaison sur l'ARNm d'*hlyCABD*.

BIBLIOGRAPHIE

- Andersen C, Hughes C & Koronakis V** (2001) Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr Opin Cell Biol* 13(4):412-416.
- Anderson GG, Palermo JJ, Schilling JD, Roth R, Heuser J & Hultgren SJ** (2003) Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* 301(5629):105-107.
- Andrews SC, Robinson AK & Rodriguez-Quinones F** (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* 27(2-3):215-237.
- Aronson M, Medalia O, Amichay D & Nativ O** (1988) Endotoxin-induced shedding of viable uroepithelial cells is an antimicrobial defense mechanism. *Infect Immun* 56(6):1615-1617.
- Bagg A & Neilands JB** (1987) Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26(17):5471-5477.
- Baichoo N & Helmann JD** (2002) Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* 184(21):5826-5832.
- Bailey MJ, Koronakis V, Schmoll T & Hughes C** (1992) *Escherichia coli* HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the *rfaH* (*sfrB*) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. *Mol Microbiol* 6(8):1003-1012.
- Bakas L, Ostolaza H, Vaz WL & Goni FM** (1996) Reversible adsorption and nonreversible insertion of *Escherichia coli* alpha-hemolysin into lipid bilayers. *Biophysical journal* 71(4):1869-1876.
- Bakas L, Veiga MP, Soloaga A, Ostolaza H & Goni FM** (1998) Calcium-dependent conformation of *E. coli* alpha-haemolysin. Implications for the mechanism of membrane insertion and lysis. *Biochimica et biophysica acta* 1368(2):225-234.
- Balakrishnan L, Hughes C & Koronakis V** (2001) Substrate-triggered recruitment of the TolC channel-tunnel during type I export of hemolysin by *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 313(3):501-510.
- Benz R, Dobereiner A, Ludwig A & Goebel W** (1992) Haemolysin of *Escherichia coli*: comparison of pore-forming properties between chromosome and plasmid-encoded haemolysins. *FEMS Microbiol Immunol* 5(1-3):55-62.
- Benz R, Maier E, Ladant D, Ullmann A & Sebo P** (1994) Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 269(44):27231-27239.
- Benz R, Schmid A, Wagner W & Goebel W** (1989) Pore formation by the *Escherichia coli* hemolysin: evidence for an association-dissociation equilibrium of the pore-forming aggregates. *Infect Immun* 57(3):887-895.
- Bhakdi S, Greulich S, Muhly M, Eberspacher B, Becker H, Thiele A & Hugo F** (1989) Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes. *The Journal of experimental medicine* 169(3):737-754.
- Bhakdi S, Mackman N, Nicaud JM & Holland IB** (1986) *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* 52(1):63-69.

- Bhakdi S, Muhly M, Korom S & Schmidt G** (1990) Effects of Escherichia coli hemolysin on human monocytes. Cytocidal action and stimulation of interleukin 1 release. *The Journal of clinical investigation* 85(6):1746-1753.
- Boehm DF, Welch RA & Snyder IS** (1990a) Calcium is required for binding of Escherichia coli hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. *Infect Immun* 58(6):1951-1958.
- Boehm DF, Welch RA & Snyder IS** (1990b) Domains of Escherichia coli hemolysin (HlyA) involved in binding of calcium and erythrocyte membranes. *Infect Immun* 58(6):1959-1964.
- Borish LC & Steinke JW** (2003) 2. Cytokines and chemokines. *The Journal of allergy and clinical immunology* 111(2 Suppl):S460-475.
- Bower JM, Eto DS & Mulvey MA** (2005) Covert operations of uropathogenic Escherichia coli within the urinary tract. *Traffic* 6(1):18-31.
- Brooks HJ, O'Grady F, McSherry MA & Cattell WR** (1980) Uropathogenic properties of Escherichia coli in recurrent urinary-tract infection. *Journal of medical microbiology* 13(1):57-68.
- Browne LE, Nunes JP, Sim JA, Chudasama V, Bragg L, Caddick S & North RA** (2014) Optical control of trimeric P2X receptors and acid-sensing ion channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(1):521-526.
- Calderwood SB & Mekalanos JJ** (1987) Iron regulation of Shiga-like toxin expression in Escherichia coli is mediated by the fur locus. *J Bacteriol* 169(10):4759-4764.
- Cavaliere SJ & Snyder IS** (1982) Effect of Escherichia coli alpha-hemolysin on human peripheral leukocyte function in vitro. *Infect Immun* 37(3):966-974.
- Chen M, Tofighi R, Bao W, Aspevall O, Jahnuainen T, Gustafsson LE, Ceccatelli S & Celsi G** (2006) Carbon monoxide prevents apoptosis induced by uropathogenic Escherichia coli toxins. *Pediatr Nephrol* 21(3):382-389.
- Cherepanov PP & Wackernagel W** (1995) Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant. *Gene* 158(1):9-14.
- Clark DP & Pazdernik NJ** (2011) *Biotechnology: Academic Cell Update Edition*. Academic Press,
- Clermont O, Bonacorsi S & Bingen E** (2000) Rapid and Simple Determination of the Escherichia coli Phylogenetic Group. *Applied and Environmental Microbiology* 66:4555-4558.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E & Gordon DM** (2013) The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environ Microbiol Rep* 5(1):58-65.
- Cooke EM & Ewins SP** (1975) Properties of strains of Escherichia coli isolated from a variety of sources. *Journal of medical microbiology* 8(1):107-111.
- Cortajarena AL, Goni FM & Ostolaza H** (2001) Glycophorin as a receptor for Escherichia coli alpha-hemolysin in erythrocytes. *The Journal of biological chemistry* 276(16):12513-12519.
- Cortajarena AL, Goni FM & Ostolaza H** (2003) A receptor-binding region in Escherichia coli alpha-haemolysin. *The Journal of biological chemistry* 278(21):19159-19163.
- Crepin S, Harel J & Dozois CM** (2012a) Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in Enterobacteriaceae. *Appl Environ Microbiol* 78(17):6001-6008.

- Crepin S, Houle S, Charbonneau ME, Mourez M, Harel J & Dozois CM** (2012b) Decreased expression of type 1 fimbriae by a pst mutant of uropathogenic Escherichia coli reduces urinary tract infection. *Infect Immun* 80(8):2802-2815.
- de Lorenzo V, Wee S, Herrero M & Neilands JB** (1987) Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J Bacteriol* 169(6):2624-2630.
- Dhakal BK & Mulvey MA** (2012) The UPEC pore-forming toxin alpha-hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways. *Cell Host Microbe* 11(1):58-69.
- Dobereiner A, Schmid A, Ludwig A, Goebel W & Benz R** (1996) The effects of calcium and other polyvalent cations on channel formation by Escherichia coli alpha-hemolysin in red blood cells and lipid bilayer membranes. *European journal of biochemistry* 240(2):454-460.
- Dong X, Stothard P, Forsythe IJ & Wishart DS** (2004) PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps. *Nucleic acids research* 32(suppl_2):W660-W664.
- Eberspacher B, Hugo F & Bhakdi S** (1989) Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin. *Infect Immun* 57(3):983-988.
- Felmlee T, Pellett S, Lee EY & Welch RA** (1985) Escherichia coli hemolysin is released extracellularly without cleavage of a signal peptide. *J Bacteriol* 163(1):88-93.
- Felmlee T & Welch RA** (1988) Alterations of amino acid repeats in the Escherichia coli hemolysin affect cytolytic activity and secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85(14):5269-5273.
- Foxman B** (2002) Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American journal of medicine* 113 Suppl 1A:5S-13S.
- Gadeberg OV, Orskov I & Rhodes JM** (1983) Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic Escherichia coli strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro. *Infect Immun* 41(1):358-364.
- Geissmann TA & Touati D** (2004) Hfq, a new chaperoning role: binding to messenger RNA determines access for small RNA regulator. *The EMBO journal* 23(2):396-405.
- Gottesman S** (2004) The small RNA regulators of Escherichia coli: roles and mechanisms*. *Annual review of microbiology* 58:303-328.
- Gray L, Mackman N, Nicaud JM & Holland IB** (1986) The carboxy-terminal region of haemolysin 2001 is required for secretion of the toxin from Escherichia coli. *Molecular & general genetics : MGG* 205(1):127-133.
- Grimminger F, Scholz C, Bhakdi S & Seeger W** (1991) Subhemolytic doses of Escherichia coli hemolysin evoke large quantities of lipooxygenase products in human neutrophils. *The Journal of biological chemistry* 266(22):14262-14269.
- Guzman LM, Belin D, Carson MJ & Beckwith J** (1995) Tight regulation, modulation, and high-level expression by vectors containing the arabinose PBAD promoter. *J Bacteriol* 177(14):4121-4130.
- Hacker J & Kaper JB** (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual review of microbiology* 54:641-679.
- Hagan EC, Donnenberg MS & Mobley HLT** (2009) Uropathogenic Escherichia coli. *EcoSal Plus* 3.
- Hantke K** (2001) Iron and metal regulation in bacteria. *Current opinion in microbiology* 4(2):172-177.

- Haraoka M, Hang L, Frendeus B, Godaly G, Burdick M, Strieter R & Svanborg C** (1999) Neutrophil recruitment and resistance to urinary tract infection. *The Journal of infectious diseases* 180(4):1220-1229.
- Herzer PJ, Inouye S, Inouye M & Whittam TS** (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 172:6175-6181.
- Hicks RM** (1975) The mammalian urinary bladder: an accommodating organ. *Biological reviews of the Cambridge Philosophical Society* 50(2):215-246.
- Hooton TM & Stamm WE** (1997) Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infectious disease clinics of North America* 11(3):551-581.
- Hubby JL & Lewontin RC** (1966) A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. I. the Number of Alleles at Different Loci in *DROSOPHILA PSEUDOOBSCURA*. *Genetics* 54:577-594.
- Hung CS, Bouckaert J, Hung D, Pinkner J, Widberg C, DeFusco A, Auguste CG, Strouse R, Langermann S, Waksman G & Hultgren SJ** (2002) Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* 44(4):903-915.
- Hyland C, Vuillard L, Hughes C & Koronakis V** (2001) Membrane interaction of *Escherichia coli* hemolysin: flotation and insertion-dependent labeling by phospholipid vesicles. *J Bacteriol* 183(18):5364-5370.
- Ikaheimo R, Siitonen A, Heiskanen T, Karkkainen U, Kuosmanen P, Lipponen P & Makela PH** (1996) Recurrence of urinary tract infection in a primary care setting: analysis of a 1-year follow-up of 179 women. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 22(1):91-99.
- Jacques JF, Jang S, Prevost K, Desnoyers G, Desmarais M, Imlay J & Masse E** (2006) RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 62(4):1181-1190.
- Jauréguy F** (2009) Déterminants cliniques et bactériens au cours des infections extra-intestinales dues à *Escherichia coli*. *médecine/sciences* 25(3):221-223.
- Jellheden B, Norrby RS & Sandberg T** (1996) Symptomatic urinary tract infection in women in primary health care. Bacteriological, clinical and diagnostic aspects in relation to host response to infection. *Scandinavian journal of primary health care* 14(2):122-128.
- Johnson JR & Russo TA** (2005) Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International journal of medical microbiology : IJMM* 295(6-7):383-404.
- Jones CH, Pinkner JS, Roth R, Heuser J, Nicholes AV, Abraham SN & Hultgren SJ** (1995) FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(6):2081-2085.
- Jorgensen SE, Mulcahy PF, Wu GK & Louis CF** (1983) Calcium accumulation in human and sheep erythrocytes that is induced by *Escherichia coli* hemolysin. *Toxicon* 21(5):717-727.
- Justice SS, Hung C, Theriot JA, Fletcher DA, Anderson GG, Footer MJ & Hultgren SJ** (2004) Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(5):1333-1338.
- Kaper JB, Nataro JP & Mobley HLT** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2:123-140.

- Kaufmann SHE, Rouse BT & Sacks DL** (2011) *The immune response to infection*. ASM Press, Washington, DC. xiii, 666 p. p
- Keane WF, Welch R, Gekker G & Peterson PK** (1987) Mechanism of Escherichia coli alpha-hemolysin-induced injury to isolated renal tubular cells. *Am J Pathol* 126(2):350-357.
- Kenny B, Haigh R & Holland IB** (1991) Analysis of the haemolysin transport process through the secretion from Escherichia coli of PCM, CAT or beta-galactosidase fused to the Hly C-terminal signal domain. *Mol Microbiol* 5(10):2557-2568.
- Kerr ID** (2002) Structure and association of ATP-binding cassette transporter nucleotide-binding domains. *Biochimica et biophysica acta* 1561(1):47-64.
- Kloft N, Busch T, Neukirch C, Weis S, Boukhallouk F, Bobkiewicz W, Cibis I, Bhakdi S & Husmann M** (2009) Pore-forming toxins activate MAPK p38 by causing loss of cellular potassium. *Biochem Biophys Res Commun* 385(4):503-506.
- Klumpp DJ, Weiser AC, Sengupta S, Forrestal SG, Batler RA & Schaeffer AJ** (2001) Uropathogenic Escherichia coli potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB. *Infect Immun* 69(11):6689-6695.
- Koronakis E, Hughes C, Milisav I & Koronakis V** (1995) Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. *Mol Microbiol* 16(1):87-96.
- Koronakis V, Eswaran J & Hughes C** (2004) Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs. *Annu Rev Biochem* 73:467-489.
- Koronakis V, Hughes C & Koronakis E** (1991) Energetically distinct early and late stages of HlyB/HlyD-dependent secretion across both Escherichia coli membranes. *The EMBO journal* 10(11):3263-3272.
- Koronakis V, Li J, Koronakis E & Stauffer K** (1997) Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals. *Mol Microbiol* 23(3):617-626.
- Koronakis V, Sharff A, Koronakis E, Luisi B & Hughes C** (2000) Crystal structure of the bacterial membrane protein TolC central to multidrug efflux and protein export. *Nature* 405(6789):914-919.
- Koster W** (2001) ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* 152(3-4):291-301.
- Kurabayashi K, Agata T, Asano H, Tomita H & Hirakawa H** (2016) Fur Represses Adhesion to, Invasion of, and Intracellular Bacterial Community Formation within Bladder Epithelial Cells and Motility in Uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 84(11):3220-3231.
- Lalaouna D, Carrier MC, Semsey S, Brouard JS, Wang J, Wade JT & Masse E** (2015) A 3' external transcribed spacer in a tRNA transcript acts as a sponge for small RNAs to prevent transcriptional noise. *Mol Cell* 58(3):393-405.
- Lally ET, Kieba IR, Sato A, Green CL, Rosenbloom J, Korostoff J, Wang JF, Shenker BJ, Ortlepp S, Robinson MK & Billings PC** (1997) RTX toxins recognize a beta2 integrin on the surface of human target cells. *The Journal of biological chemistry* 272(48):30463-30469.
- Landraud L, Gibert M, Popoff MR, Boquet P & Gauthier M** (2003) Expression of cnf1 by Escherichia coli J96 involves a large upstream DNA region including the hlyCABD operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol Microbiol* 47(6):1653-1667.

- Lecointre G, Rachdi L, Darlu P & Denamur E** (1998) Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test. *Molecular Biology and Evolution* 15:1685-1695.
- Lee M, Jun SY, Yoon BY, Song S, Lee K & Ha NC** (2012) Membrane fusion proteins of type I secretion system and tripartite efflux pumps share a binding motif for TolC in gram-negative bacteria. *PloS one* 7(7):e40460.
- Leeds JA & Welch RA** (1996) RfaH enhances elongation of Escherichia coli hlyCABD mRNA. *J Bacteriol* 178(7):1850-1857.
- Leeds JA & Welch RA** (1997) Enhancing transcription through the Escherichia coli hemolysin operon, hlyCABD: RfaH and upstream JUMPStart DNA sequences function together via a postinitiation mechanism. *J Bacteriol* 179(11):3519-3527.
- Letoffe S, Delepelaire P & Wandersman C** (1996) Protein secretion in gram-negative bacteria: assembly of the three components of ABC protein-mediated exporters is ordered and promoted by substrate binding. *The EMBO journal* 15(21):5804-5811.
- Levine MM** (1987) Escherichia coli that Cause Diarrhea: Enterotoxigenic, Enteropathogenic, Enteroinvasive, Enterohemorrhagic, and Enteroadherent. *Journal of Infectious Diseases* 155:377-389.
- Lewis SA** (2000) Everything you wanted to know about the bladder epithelium but were afraid to ask. *American journal of physiology. Renal physiology* 278(6):F867-874.
- Lewontin RC & Hubby JL** (1966) A Molecular Approach to the Study of Genic Heterozygosity in Natural Populations. II. Amount of Variation and Degree of Heterozygosity in Natural Populations of Drosophila Pseudoobscura. *Genetics* 54:595-609.
- Lim KB, Walker CR, Guo L, Pellett S, Shabanowitz J, Hunt DF, Hewlett EL, Ludwig A, Goebel W, Welch RA & Hackett M** (2000) Escherichia coli alpha-hemolysin (HlyA) is heterogeneously acylated in vivo with 14-, 15-, and 17-carbon fatty acids. *The Journal of biological chemistry* 275(47):36698-36702.
- Linhartova I, Bumba L, Masin J, Basler M, Osicka R, Kamanova J, Prochazkova K, Adkins I, Hejnova-Holubova J, Sadilkova L, Morova J & Sebo P** (2010) RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism. *FEMS Microbiol Rev* 34(6):1076-1112.
- Litwin CM & Calderwood SB** (1993) Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* 6(2):137-149.
- Ludwig A, Schmid A, Benz R & Goebel W** (1991) Mutations affecting pore formation by haemolysin from Escherichia coli. *Molecular & general genetics : MGG* 226(1-2):198-208.
- Madigan MT** (2012) *Brock biology of microorganisms*. Benjamin Cummings, San Francisco, 13th. xxviii, 1043, 1077 p. p
- Madrid C, Nieto JM, Paytubi S, Falconi M, Gualerzi CO & Juarez A** (2002) Temperature- and H-NS-dependent regulation of a plasmid-encoded virulence operon expressing Escherichia coli hemolysin. *J Bacteriol* 184(18):5058-5066.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M & Spratt BG** (1998) Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95:3140-3145.

- Majdalani N, Cuning C, Sledjeski D, Elliott T & Gottesman S** (1998) DsrA RNA regulates translation of RpoS message by an anti-antisense mechanism, independent of its action as an antisilencer of transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(21):12462-12467.
- Mansson LE, Kjall P, Pellett S, Nagy G, Welch RA, Backhed F, Frisan T & Richter-Dahlfors A** (2007a) Role of the lipopolysaccharide-CD14 complex for the activity of hemolysin from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75(2):997-1004.
- Mansson LE, Melican K, Boekel J, Sandoval RM, Hautefort I, Tanner GA, Molitoris BA & Richter-Dahlfors A** (2007b) Real-time studies of the progression of bacterial infections and immediate tissue responses in live animals. *Cellular microbiology* 9(2):413-424.
- Marrs CF, Zhang L & Foxman B** (2005) *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters* 252:183-190.
- Marrs CF, Zhang L, Tallman P, Manning SD, Somsel P, Raz P, Colodner R, Jantunen ME, Siitonen A, Saxen H & Foxman B** (2002) Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *Journal of medical microbiology* 51(2):138-142.
- Martinez JJ, Mulvey MA, Schilling JD, Pinkner JS & Hultgren SJ** (2000) Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *The EMBO journal* 19(12):2803-2812.
- Masse E, Escorcía FE & Gottesman S** (2003) Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes & development* 17(19):2374-2383.
- Masse E & Gottesman S** (2002) A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(7):4620-4625.
- Masse E, Salvail H, Desnoyers G & Arguin M** (2007) Small RNAs controlling iron metabolism. *Current opinion in microbiology* 10(2):140-145.
- Masse E, Vanderpool CK & Gottesman S** (2005) Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 187(20):6962-6971.
- Meighen EA** (1993) Bacterial bioluminescence: organization, regulation, and application of the lux genes. *FASEB J* 7(11):1016-1022.
- Menestrina G, Mackman N, Holland IB & Bhakdi S** (1987) *Escherichia coli* haemolysin forms voltage-dependent ion channels in lipid membranes. *Biochimica et biophysica acta* 905(1):109-117.
- Menestrina G, Moser C, Pellet S & Welch R** (1994) Pore-formation by *Escherichia coli* hemolysin (HlyA) and other members of the RTX toxins family. *Toxicology* 87(1-3):249-267.
- Meng J, LeJeune JT, Zhao T & Doyle MP** (2013) Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology*, American Society of Microbiology, doi:10.1128/9781555818463.ch12.
- Miller J** (1972) Assay of β -galactosidase. *Experiments in molecular genetics* :352-355.
- Miller J** (1992) Procedures for working with lac. *A Short Course in Bacterial Genetics* :72-74.
- Moayeri M & Welch RA** (1997) Prelytic and lytic conformations of erythrocyte-associated *Escherichia coli* hemolysin. *Infect Immun* 65(6):2233-2239.

- Mobley H, Green D, Trifillis A, Johnson D, Chippendale G, Lockett C, Jones B & Warren J** (1990) Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infection and immunity* 58(5):1281-1289.
- Mourino M, Munoz F, Balsalobre C, Diaz P, Madrid C & Juarez A** (1994) Environmental regulation of alpha-haemolysin expression in *Escherichia coli*. *Microb Pathog* 16(4):249-259.
- Mulvey MA** (2002) Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology* 4(5):257-271.
- Mulvey MA, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J & Hultgren SJ** (1998) Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282(5393):1494-1497.
- Mulvey MA, Schilling JD & Hultgren SJ** (2001) Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 69(7):4572-4579.
- Mulvey MA, Schilling JD, Martinez JJ & Hultgren SJ** (2000) Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(16):8829-8835.
- Mysorekar IU, Mulvey MA, Hultgren SJ & Gordon JI** (2002) Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry* 277(9):7412-7419.
- Nagamatsu K, Hannan TJ, Guest RL, Kostakioti M, Hadjifrangiskou M, Binkley J, Dodson K, Raivio TL & Hultgren SJ** (2015) Dysregulation of *Escherichia coli* alpha-hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112(8):E871-880.
- Nataro JP, Bopp CA, Fields PI, Kaper JB & Strockbine NA** (2011) *Escherichia*, shigella, and salmonella. *Manual of Clinical Microbiology, 10th Edition*, American Society of Microbiology. p 603-626.
- Nataro JP & Kaper JB** (1998) Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 11:142-201.
- O'Gorman MRG & Donnenberg AD** (2008) *Handbook of human immunology*. CRC Press, Boca Raton, 2e éd. xv, 623 p. p
- Ostolaza H, Bartolome B, Ortiz de Zarate I, de la Cruz F & Goni FM** (1993) Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin alpha-haemolysin. *Biochimica et biophysica acta* 1147(1):81-88.
- Ostolaza H, Bartolome B, Serra JL, de la Cruz F & Goni FM** (1991) Alpha-haemolysin from *E. coli*. Purification and self-aggregation properties. *FEBS letters* 280(2):195-198.
- Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF & Henderson IR** (2004) PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett* 230(1):73-83.
- Payne SM & Mey AR** (2004) Pathogenic *Escherichia coli*, Shigella, and Salmonella. *Iron transport in bacteria* :199-218.
- Penuela S, Gehi R & Laird DW** (2013) The biochemistry and function of pannexin channels. *Biochimica et biophysica acta* 1828(1):15-22.
- Perry RD** (2004) *Yersinia*. *Iron Transport in Bacteria*, American Society of Microbiology, doi:10.1128/9781555816544.ch15.

- Peters JE & Craig NL** (2001) Tn7: smarter than we thought. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(11):806-814.
- Platt R, Drescher C, Park SK & Phillips GJ** (2000) Genetic system for reversible integration of DNA constructs and lacZ gene fusions into the Escherichia coli chromosome. *Plasmid* 43(1):12-23.
- Pohlert T** (2015) PMCMR: Calculate pairwise multiple comparisons of mean rank sums. *R package version 1*.
- Poolman JT & Wacker M** (2016) Extraintestinal Pathogenic Escherichia coli, a Common Human Pathogen: Challenges for Vaccine Development and Progress in the Field. *Journal of Infectious Diseases* 213:6-13.
- Porcheron G & Dozois CM** (2015) Interplay between iron homeostasis and virulence: Fur and RyhB as major regulators of bacterial pathogenicity. *Veterinary microbiology* 179(1-2):2-14.
- Porcheron G, Garenaux A, Proulx J, Sabri M & Dozois CM** (2013) Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Frontiers in cellular and infection microbiology* 3:90.
- Porcheron G, Habib R, Houle S, Caza M, Lepine F, Daigle F, Masse E & Dozois CM** (2014) The small RNA RyhB contributes to siderophore production and virulence of uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* 82(12):5056-5068.
- Prevost K, Salvail H, Desnoyers G, Jacques JF, Phaneuf E & Masse E** (2007) The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* 64(5):1260-1273.
- Rennie RP, Freer JH & Arbuthnott JP** (1974) The kinetics of erythrocyte lysis by Escherichia coli haemolysin. *Journal of medical microbiology* 7(2):189-195.
- Ristow LC & Welch RA** (2016) Hemolysin of uropathogenic Escherichia coli: A cloak or a dagger? *Biochimica et biophysica acta* 1858(3):538-545.
- Roland K, Curtiss III R & Sizemore D** (1999) Construction and evaluation of a Δ cya Δ crp Salmonella typhimurium strain expressing avian pathogenic Escherichia coli O78 LPS as a vaccine to prevent airsacculitis in chickens. *Avian diseases* :429-441.
- Ronald A** (2002) The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American journal of medicine* 113(1):14-19.
- Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA & Hultgren SJ** (2007) Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med* 4(12):e329.
- Ruiz-Perez F & Nataro JP** (2014) Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 71(5):745-770.
- Russo TA, Davidson BA, Genagon SA, Warholc NM, Macdonald U, Pawlicki PD, Beanan JM, Olson R, Holm BA & Knight PR, 3rd** (2005) E. coli virulence factor hemolysin induces neutrophil apoptosis and necrosis/lysis in vitro and necrosis/lysis and lung injury in a rat pneumonia model. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 289(2):L207-216.
- Russo TA & Johnson JR** (2000) Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. *The Journal of infectious diseases* 181(5):1753-1754.

- Sabri M, Houle S & Dozois CM** (2009) Roles of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ZnuACB and ZupT zinc transporters during urinary tract infection. *Infect Immun* 77(3):1155-1164.
- Salvail H, Lanthier-Bourbonnais P, Sobota JM, Caza M, Benjamin JA, Mendieta ME, Lepine F, Dozois CM, Imlay J & Masse E** (2010) A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107(34):15223-15228.
- Salvail H & Masse E** (2012) Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 3(1):26-36.
- Sanchez-Magraner L, Viguera AR, Garcia-Pacios M, Garcillan MP, Arrondo JL, de la Cruz F, Goni FM & Ostolaza H** (2007) The calcium-binding C-terminal domain of *Escherichia coli* alpha-hemolysin is a major determinant in the surface-active properties of the protein. *The Journal of biological chemistry* 282(16):11827-11835.
- Schilling JD, Lorenz RG & Hultgren SJ** (2002) Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole on recurrent bacteriuria and bacterial persistence in mice infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70(12):7042-7049.
- Schilling JD, Mulvey MA, Vincent CD, Lorenz RG & Hultgren SJ** (2001) Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *J Immunol* 166(2):1148-1155.
- Schindel C, Zitzer A, Schulte B, Gerhards A, Stanley P, Hughes C, Koronakis V, Bhakdi S & Palmer M** (2001) Interaction of *Escherichia coli* hemolysin with biological membranes. A study using cysteine scanning mutagenesis. *European journal of biochemistry* 268(3):800-808.
- Schleif R** (2010) AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol Rev* 34(5):779-796.
- Schmitt L, Benabdelhak H, Blight MA, Holland IB & Stubbs MT** (2003) Crystal structure of the nucleotide-binding domain of the ABC-transporter haemolysin B: identification of a variable region within ABC helical domains. *J Mol Biol* 330(2):333-342.
- Schulein R, Gentschev I, Mollenkopf HJ & Goebel W** (1992) A topological model for the haemolysin translocator protein HlyD. *Molecular & general genetics : MGG* 234(1):155-163.
- Sears CL & Kaper JB** (1996) Enteric bacterial toxins: mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiological Reviews* 60:167-215.
- Short EC & Kurtz HJ** (1971) Properties of the Hemolytic Activities of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 3(5):678-687.
- Simons RW, Houman F & Kleckner N** (1987) Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions. *Gene* 53(1):85-96.
- Skals M, Jorgensen NR, Leipziger J & Praetorius HA** (2009) Alpha-hemolysin from *Escherichia coli* uses endogenous amplification through P2X receptor activation to induce hemolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(10):4030-4035.
- Smith YC, Rasmussen SB, Grande KK, Conran RM & O'Brien AD** (2008) Hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli* evokes extensive shedding of the uroepithelium and hemorrhage in bladder tissue within the first 24 hours after intraurethral inoculation of mice. *Infect Immun* 76(7):2978-2990.

- Soloaga A, Ostolaza H, Goni FM & de la Cruz F** (1996) Purification of Escherichia coli pro-haemolysin, and a comparison with the properties of mature alpha-haemolysin. *European journal of biochemistry* 238(2):418-422.
- Soloaga A, Ramirez JM & Goni FM** (1998) Reversible denaturation, self-aggregation, and membrane activity of Escherichia coli alpha-hemolysin, a protein stable in 6 M urea. *Biochemistry* 37(18):6387-6393.
- Stanley P, Koronakis V & Hughes C** (1998) Acylation of Escherichia coli hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 62(2):309-333.
- Stanley P, Packman LC, Koronakis V & Hughes C** (1994) Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of Escherichia coli hemolysin. *Science* 266(5193):1992-1996.
- Stanley T & Wilson IG** (2003) Multilocus enzyme electrophoresis. *Molecular Biotechnology* 24:203-220.
- Stenutz R, Weintraub A & Widmalm G** (2006) The structures of Escherichia coli O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews* 30:382-403.
- Sussman M** (1997) *Escherichia coli: mechanisms of virulence*. Cambridge University Press, Cambridge
- Suttorp N, Floer B, Schnittler H, Seeger W & Bhakdi S** (1990) Effects of Escherichia coli hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* 58(11):3796-3801.
- Svanborg C, Godaly G & Hedlund M** (1999) Cytokine responses during mucosal infections: role in disease pathogenesis and host defence. *Current opinion in microbiology* 2(1):99-105.
- Team RC** (2014) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing; 2014.).
- Thanabalu T, Koronakis E, Hughes C & Koronakis V** (1998) Substrate-induced assembly of a contiguous channel for protein export from E.coli: reversible bridging of an inner-membrane translocase to an outer membrane exit pore. *The EMBO journal* 17(22):6487-6496.
- Thanassi DG, Nuccio SP, Shu Kin So S & Baumler AJ** (2007) Fimbriae: Classification and Biochemistry. *EcoSal Plus* 2(2).
- Thomas S, Holland IB & Schmitt L** (2014) The Type 1 secretion pathway - the hemolysin system and beyond. *Biochimica et biophysica acta* 1843(8):1629-1641.
- Tjaden B, Goodwin SS, Opdyke JA, Guillier M, Fu DX, Gottesman S & Storz G** (2006) Target prediction for small, noncoding RNAs in bacteria. *Nucleic acids research* 34(9):2791-2802.
- Touati D** (2000) Iron and oxidative stress in bacteria. *Archives of biochemistry and biophysics* 373(1):1-6.
- TranVan Nhieu G, Clair C, Grompone G & Sansonetti P** (2004) Calcium signalling during cell interactions with bacterial pathogens. *Biol Cell* 96(1):93-101.
- Trent MS, Worsham LM & Ernst-Fonberg ML** (1998) The biochemistry of hemolysin toxin activation: characterization of HlyC, an internal protein acyltransferase. *Biochemistry* 37(13):4644-4652.
- Uhlen P, Laestadius A, Jahnukainen T, Soderblom T, Backhed F, Celsi G, Brismar H, Normark S, Aperia A & Richter-Dahlfors A** (2000) Alpha-haemolysin of uropathogenic E. coli induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells. *Nature* 405(6787):694-697.

- Valeva A, Walev I, Kemmer H, Weis S, Siegel I, Boukhallouk F, Wassenaar TM, Chavakis T & Bhakdi S** (2005) Binding of Escherichia coli hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent. *The Journal of biological chemistry* 280(44):36657-36663.
- Wandersman C & Letoffe S** (1993) Involvement of lipopolysaccharide in the secretion of Escherichia coli alpha-haemolysin and Erwinia chrysanthemi proteases. *Mol Microbiol* 7(1):141-150.
- Wandersman C & Stojiljkovic I** (2000) Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current opinion in microbiology* 3(2):215-220.
- Weaver RF** (2012) *Molecular biology*. McGraw-Hill, New York, 5th. xx, 892 p. p
- Welch RA** (1991) Pore-forming cytolysins of gram-negative bacteria. *Mol Microbiol* 5(3):521-528.
- Welch RA** (2001) RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. *Current topics in microbiology and immunology* 257:85-111.
- Welch RA & Pellett S** (1988) Transcriptional organization of the Escherichia coli hemolysin genes. *J Bacteriol* 170(4):1622-1630.
- Whitfield C** (2009) Structure and Assembly of Escherichia coli Capsules. *EcoSal Plus* 3.
- Whitfield C & Roberts IS** (1999) Structure, assembly and regulation of expression of capsules in Escherichia coli. *Molecular Microbiology* 31:1307-1319.
- Wiles TJ, Dhakal BK, Eto DS & Mulvey MA** (2008a) Inactivation of host Akt/protein kinase B signaling by bacterial pore-forming toxins. *Molecular biology of the cell* 19(4):1427-1438.
- Wiles TJ, Kulesus RR & Mulvey MA** (2008b) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. *Experimental and Molecular Pathology* 85:11-19.
- Wiles TJ & Mulvey MA** (2013) The RTX pore-forming toxin alpha-hemolysin of uropathogenic Escherichia coli: progress and perspectives. *Future microbiology* 8(1):73-84.
- Winkelmann G** (2002) Microbial siderophore-mediated transport. *Biochemical Society transactions* 30(4):691-696.
- Worsham LM, Langston KG & Ernst-Fonberg ML** (2005) Thermodynamics of a protein acylation: activation of Escherichia coli hemolysin toxin. *Biochemistry* 44(4):1329-1337.
- Worsham LM, Trent MS, Earls L, Jolly C & Ernst-Fonberg ML** (2001) Insights into the catalytic mechanism of HlyC, the internal protein acyltransferase that activates Escherichia coli hemolysin toxin. *Biochemistry* 40(45):13607-13616.
- Wu XR, Medina JJ & Sun TT** (1995) Selective interactions of UPIa and UPIb, two members of the transmembrane 4 superfamily, with distinct single transmembrane-domained proteins in differentiated urothelial cells. *The Journal of biological chemistry* 270(50):29752-29759.
- Wu XR, Sun TT & Medina JJ** (1996) In vitro binding of type 1-fimbriated Escherichia coli to uroplakins Ia and Ib: relation to urinary tract infections. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93(18):9630-9635.
- Zaitseva J, Jenewein S, Wiedenmann A, Benabdelhak H, Holland IB & Schmitt L** (2005) Functional characterization and ATP-induced dimerization of the isolated ABC-domain of the haemolysin B transporter. *Biochemistry* 44(28):9680-9690.

ANNEXES

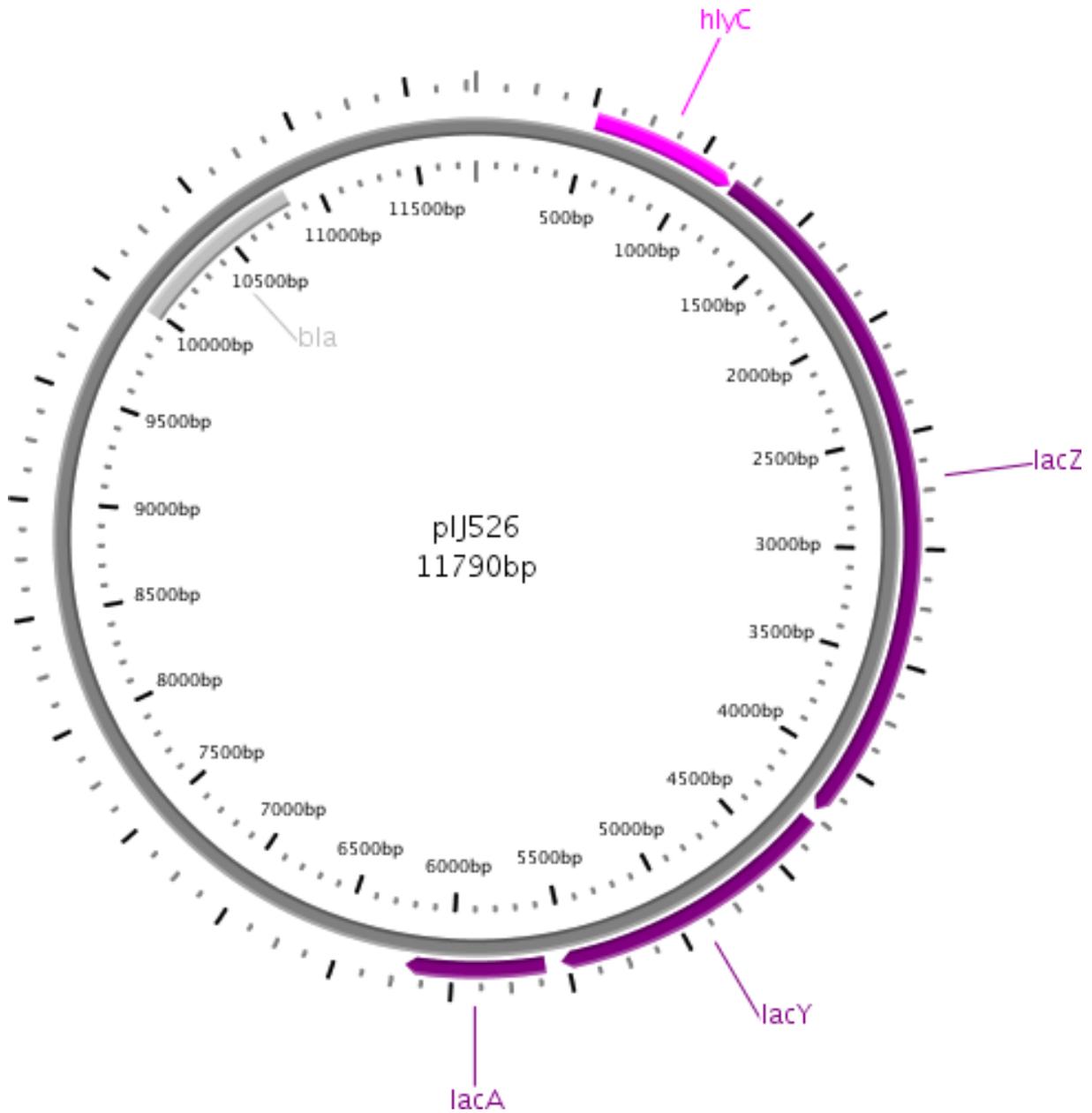


Figure S1. pIJ526. Plasmide multicopie contenant la fusion traductionnelle *PhlyC::lac*. Le gène *hlyC* de l'opéron *hly* de la souche CFT073 est représenté en rose, les gènes de l'opéron *lac* sont en violet et le gène de résistance à l'ampicilline, *bla*, est représenté en gris. Carte obtenue à l'aide du logiciel PlasMapper (Dong et al., 2004).

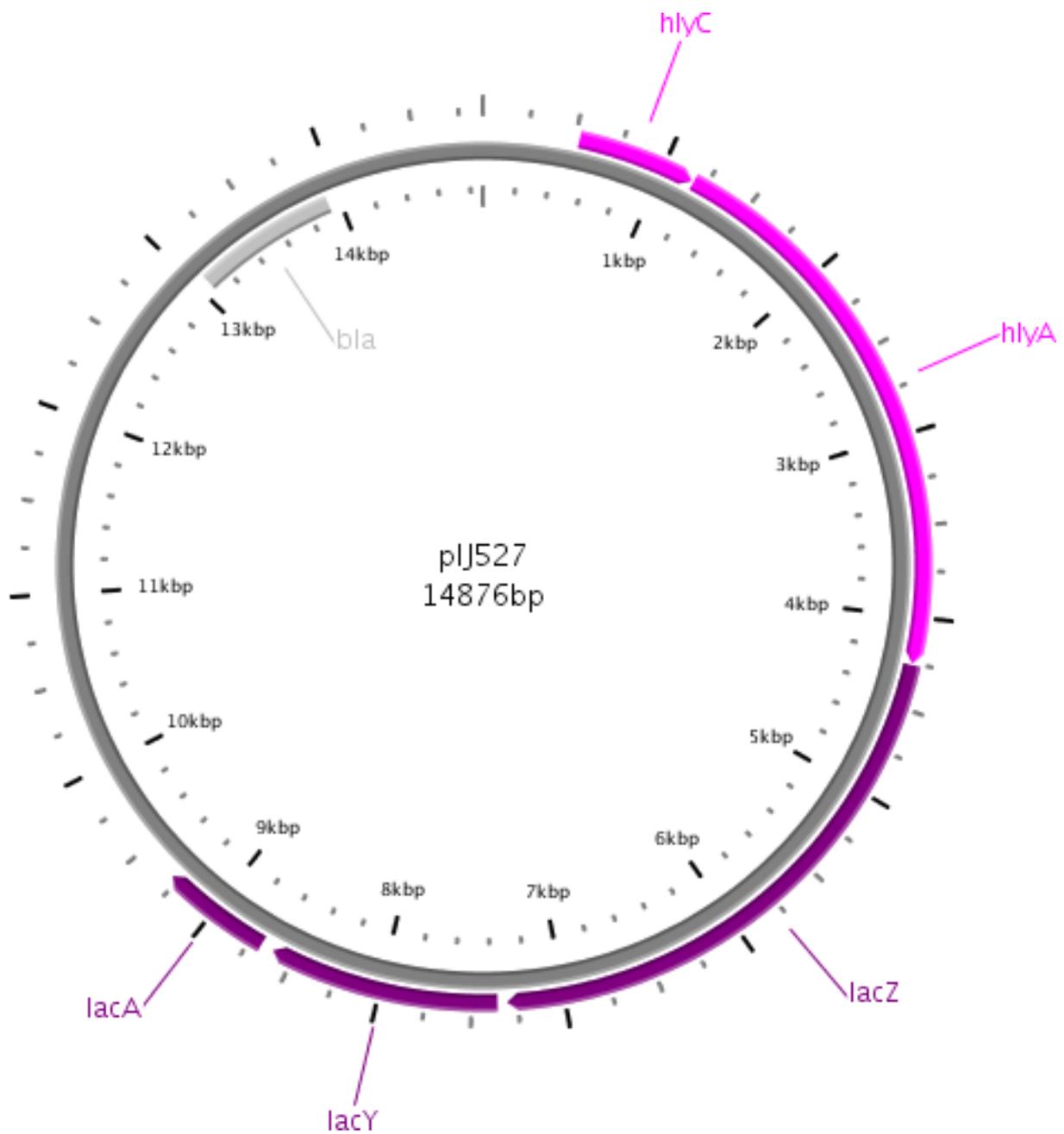


Figure S2. pIJ527. Plasmide multicopie contenant la fusion traductionnelle *PhlyCA::lac*. Les gènes *hlyC* et *hlyA* de l'opéron *hly* de CFT073 sont représentés en rose, les gènes de l'opéron *lac* sont en violet et le gène de résistance à l'ampicilline, *bla*, est représenté en gris. Carte obtenue à l'aide du logiciel PlasMapper (Dong et al., 2004).

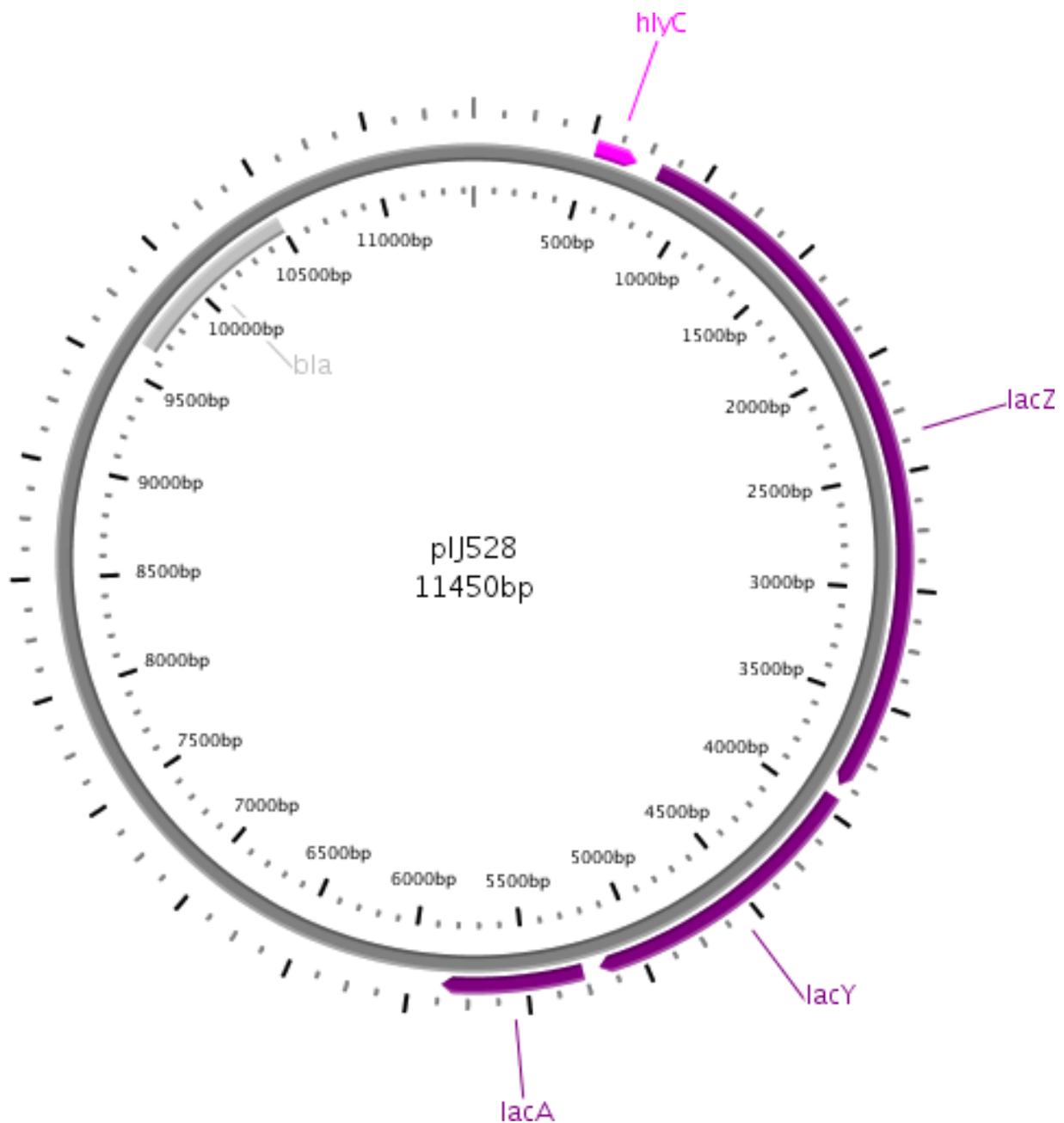


Figure S3. pIJ528. Plasmide multicopie contenant la fusion transcriptionnelle *Phly::lac*. Le début du gène *hlyC* de l'opéron *hly* de CFT073 est représenté en rose, les gènes de l'opéron *lac* sont en violet et le gène de résistance à l'ampicilline, *bla*, est représenté en gris. Carte obtenue à l'aide du logiciel PlasMapper (Dong et al., 2004).

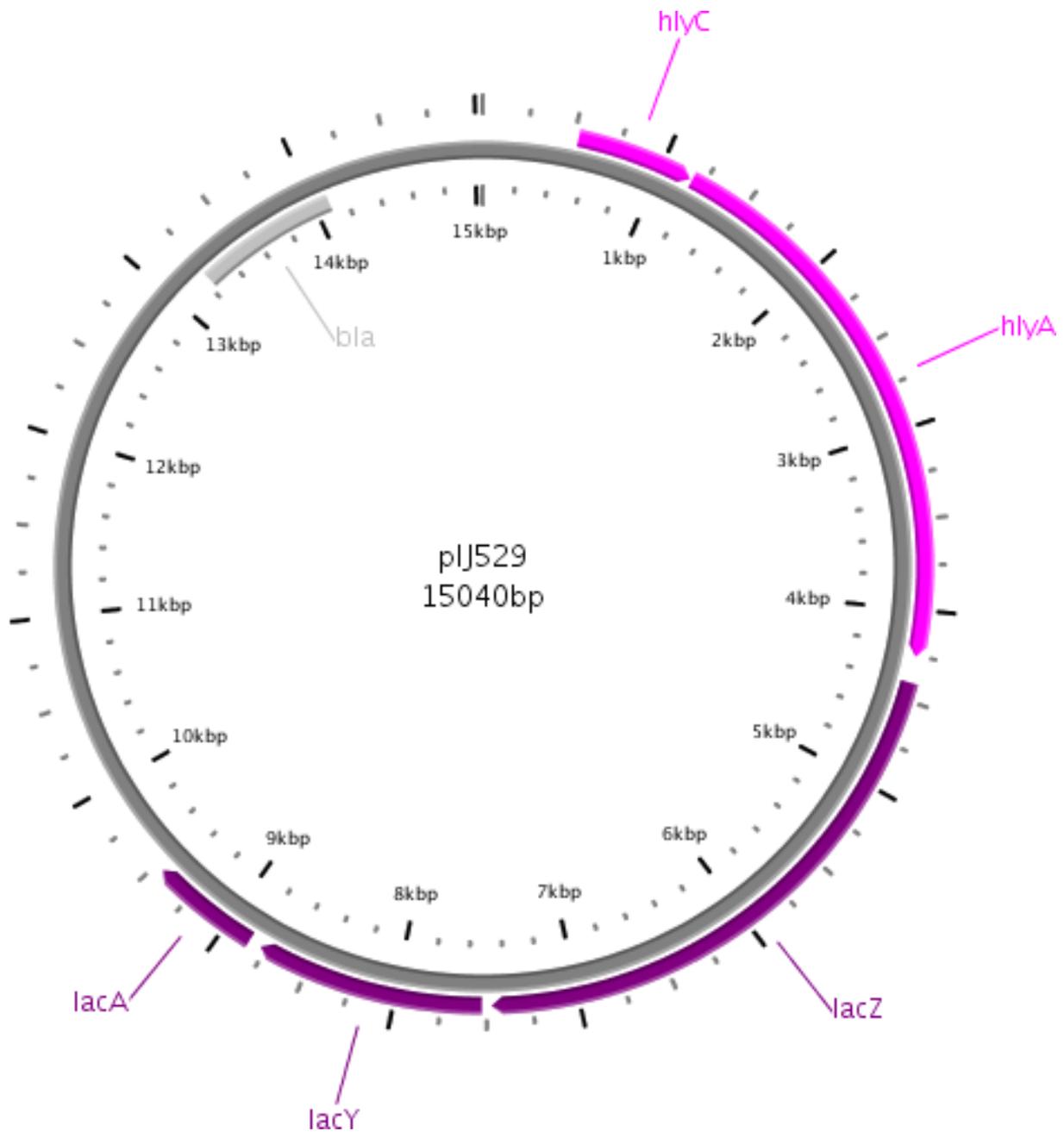


Figure S4. pIJ529. Plasmide multicopie contenant la fusion transcriptionnelle *PhlyCA::lac*. Les gènes *hlyC* et *hlyA* de l'opéron *hly* de CFT073 sont représentés en rose, les gènes de l'opéron *lac* sont en violet et le gène de résistance à l'ampicilline, *bla*, est représenté en gris. Carte obtenue à l'aide du logiciel PlasMapper (Dong et al., 2004).

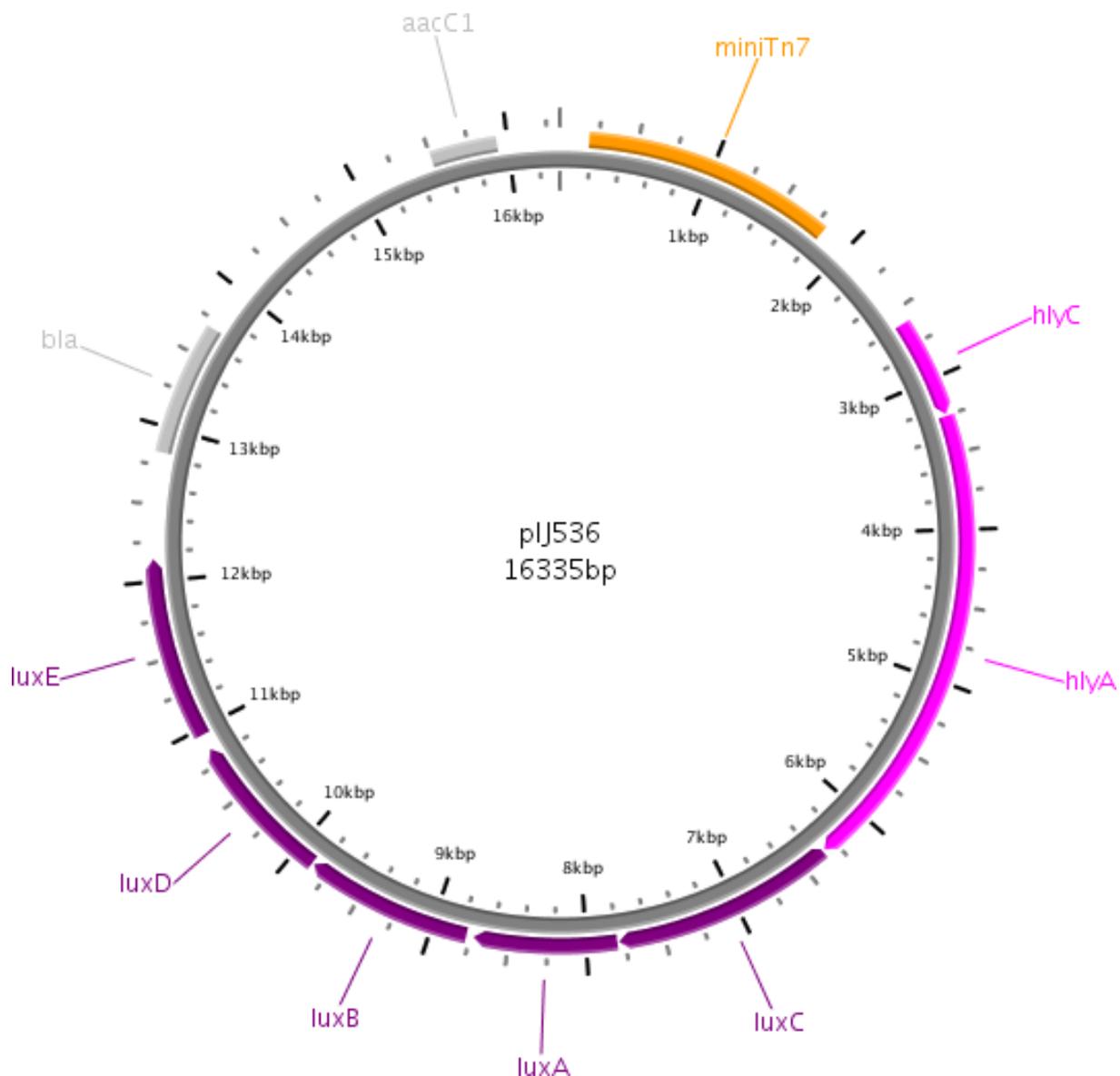


Figure S5. pIJ536. Plasmide contenant la fusion transcriptionnelle *PhlyCA::lux* intégrable. Le miniTn7, mobilisable par les transposases du plasmide pSTNSK, est représenté en orange, les gènes *hlyC* et *hlyA* de l'opéron *hly* de CFT073 sont représentés en rose, les gènes de l'opéron *lac* sont en violet et les gènes de résistance à l'ampicilline, *bla*, et à la gentamicine, *aacC1*, sont représentés en gris. Carte obtenue à l'aide du logiciel PlasMapper (Dong et al., 2004).

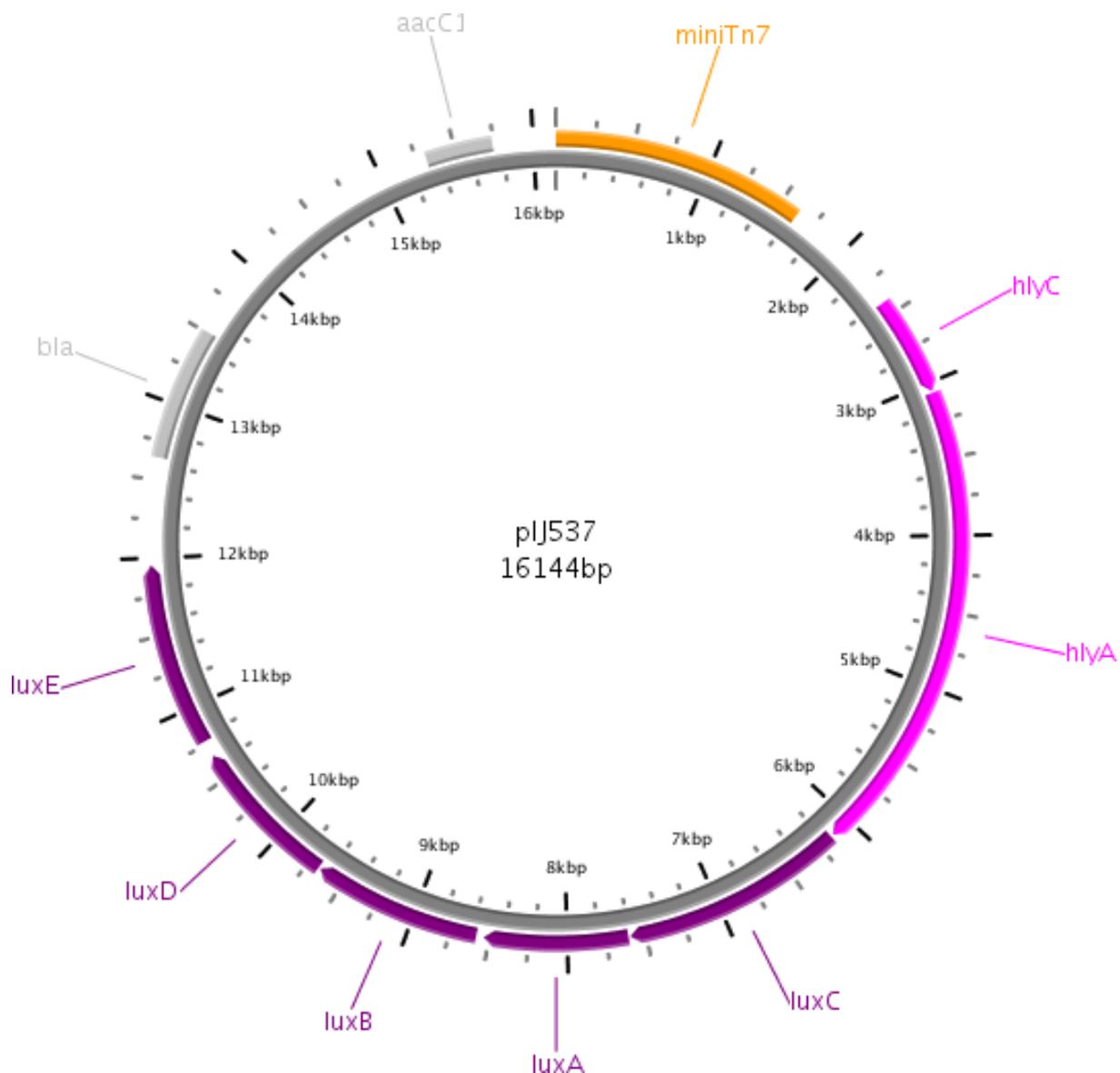


Figure S6. pIJ537. Plasmide contenant la fusion traductionnelle *PhlyCA::lux* intégrable. Le miniTn7, mobilisable par les transposases du plasmide pSTNSK, est représenté en orange, les gènes *hlyC* et *hlyA* de l'opéron *hly* de CFT073 sont représentés en rose, les gènes de l'opéron *lac* sont en violet et les gènes de résistance à l'ampicilline, *bla*, et à la gentamicine, *aacC1*, sont représentés en gris. Carte obtenue à l'aide du logiciel PlasMapper (Dong et al., 2004).

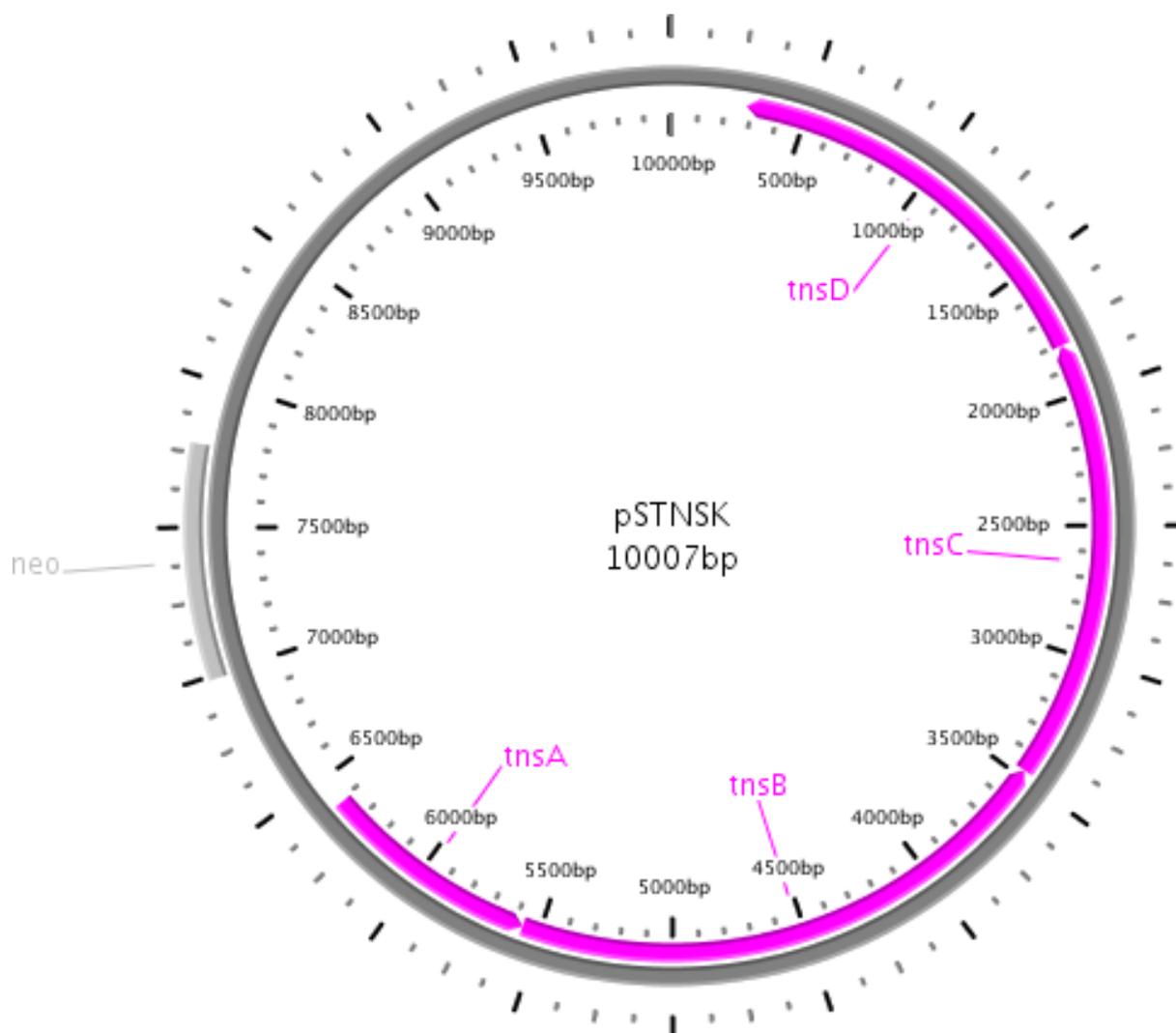


Figure S7. pSTNSK. Plasmide contenant les éléments nécessaires à l'intégration des fusions *lux* depuis les plasmides pIJ536 et pIJ537. Les gènes codant pour les transposases *tnsD*, *tnsC*, *tnsB* et *tnsA* sont représentés en rose et le gène de résistance à la kanamycine, *neo*, est représenté en gris. Carte obtenue à l'aide du logiciel PlasMapper (Dong et al., 2004).

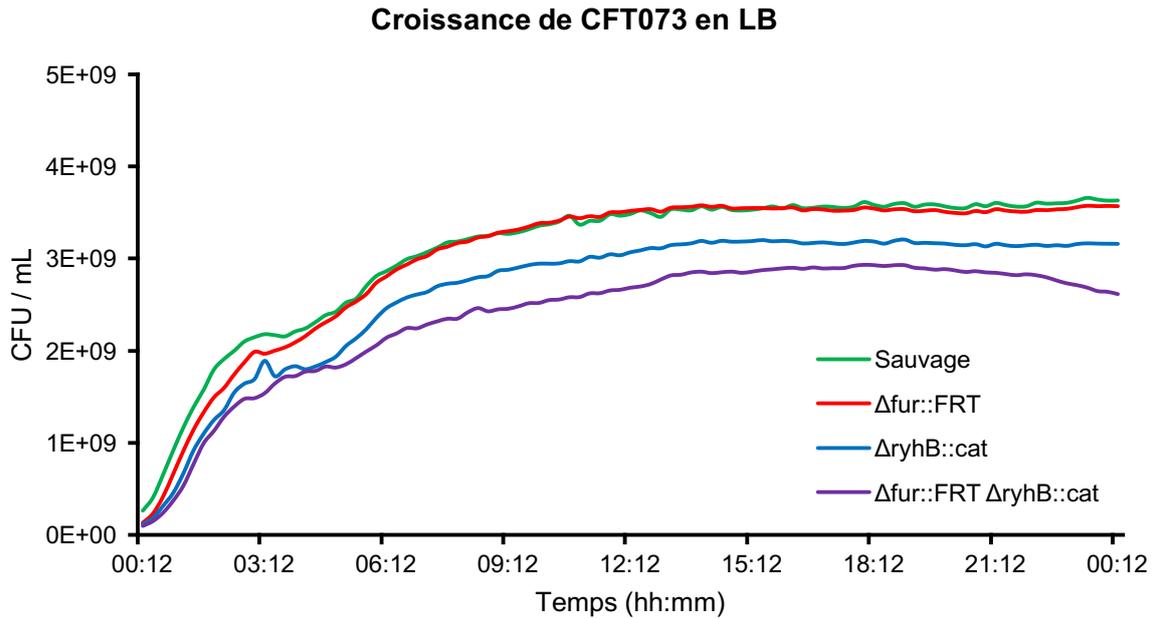


Figure S8. Croissance de CFT073 en LB. La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 15 minutes à l'aide du système Cytation. Courbes de croissance correspondant aux résultats présentés dans les figures 26 et 29.

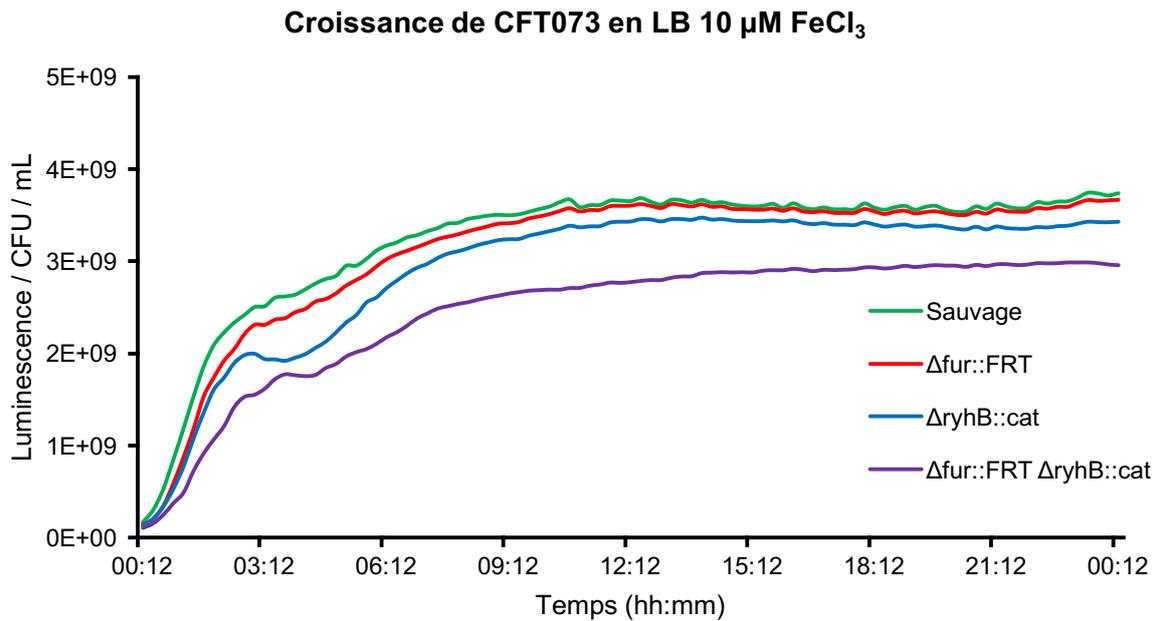


Figure S9. Croissance de CFT073 en LB 10 μM $FeCl_3$. La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 15 minutes à l'aide du système Cytation. Courbes de croissance correspondant aux résultats présentés dans les figures 27 et 30.

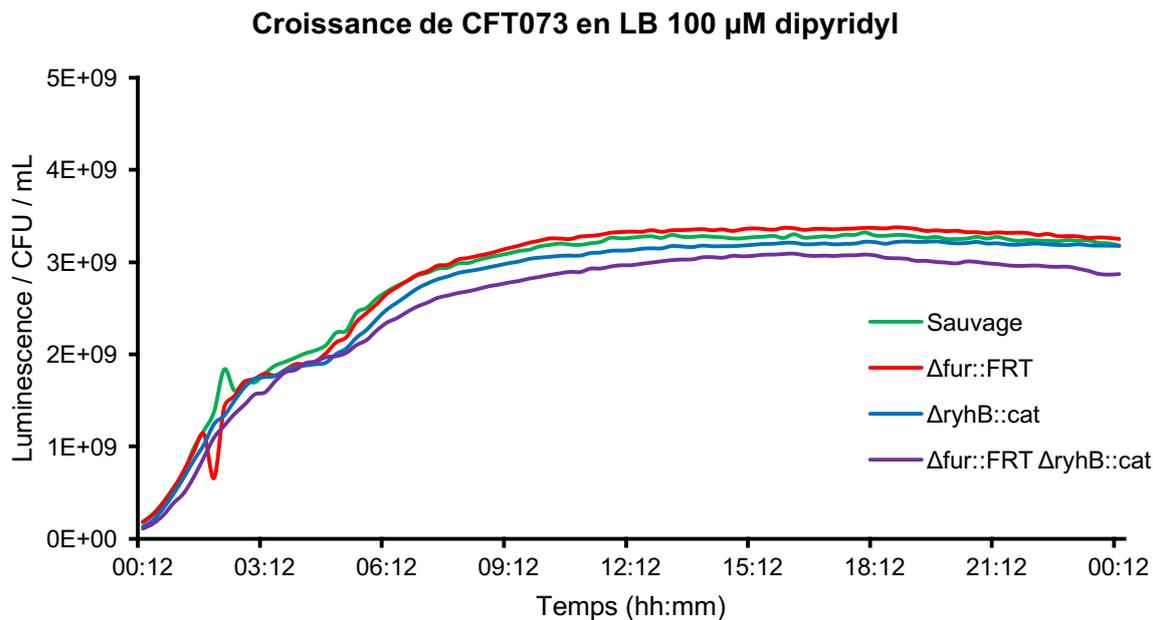


Figure S10. Croissance de CFT073 en LB 100 μ M dipyridyl. La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 15 minutes à l'aide du système Cytation. Courbes de croissance correspondant aux résultats présentés dans les figures 28 et 31.

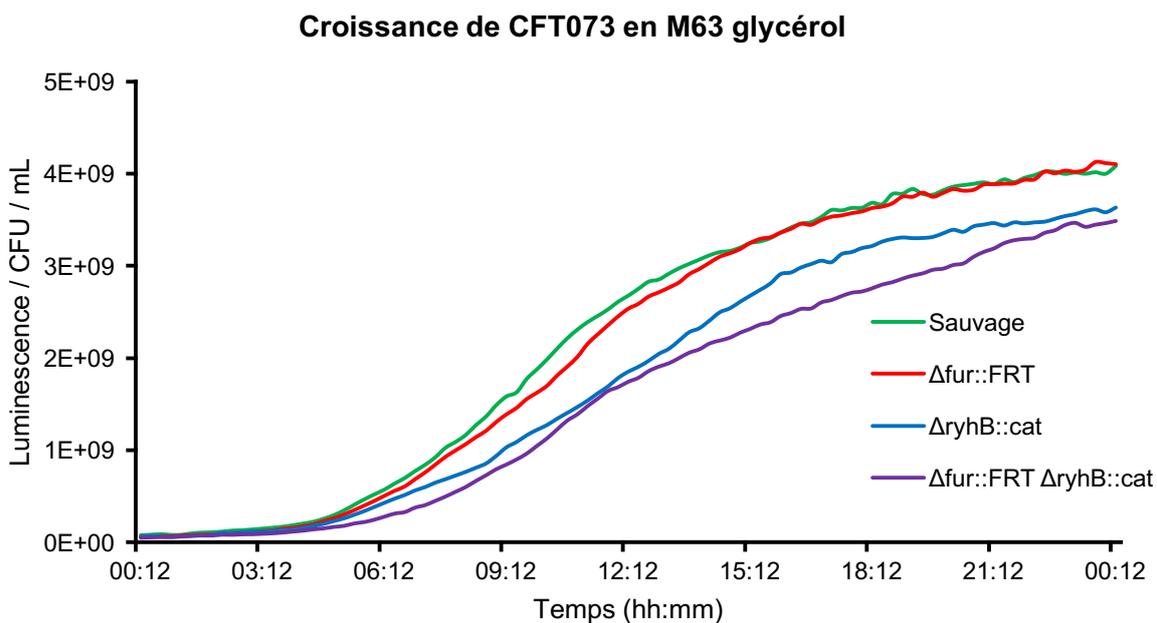


Figure S11. Croissance de CFT073 en M63 glycérol. La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 15 minutes à l'aide du système Cytation. Courbes de croissance correspondant aux résultats présentés dans les figures 32 et 35.

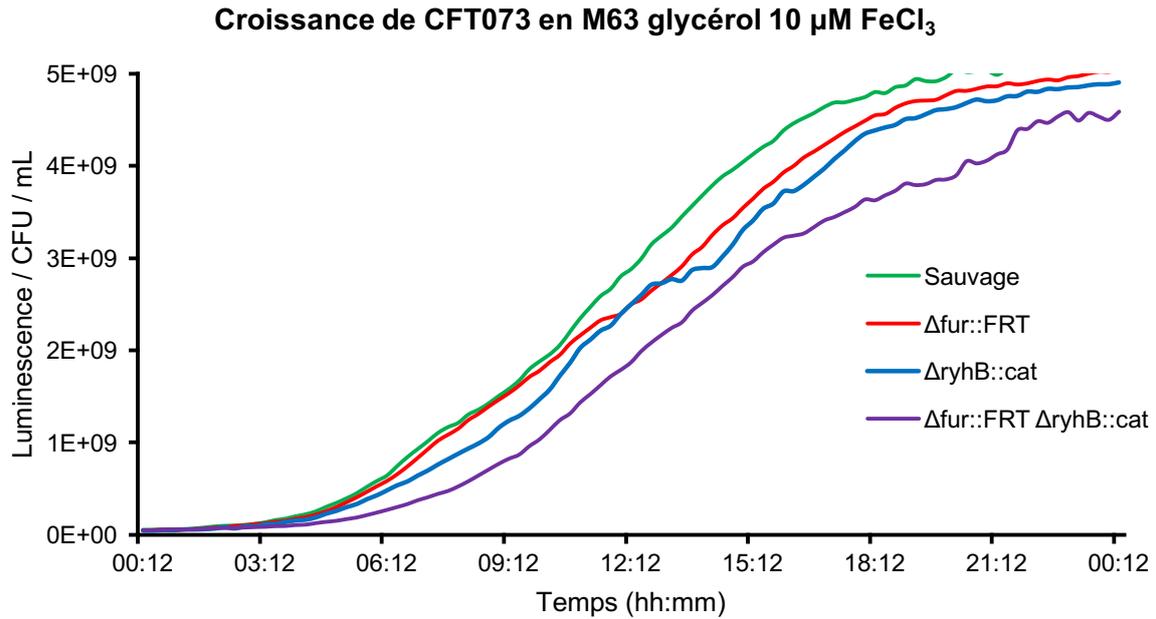


Figure S13. Croissance de CFT073 en M63 glycérol 10 μM FeCl_3 . La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 15 minutes à l'aide du système Cytation. Courbes de croissance correspondant aux résultats présentés dans les figures 33 et 36.

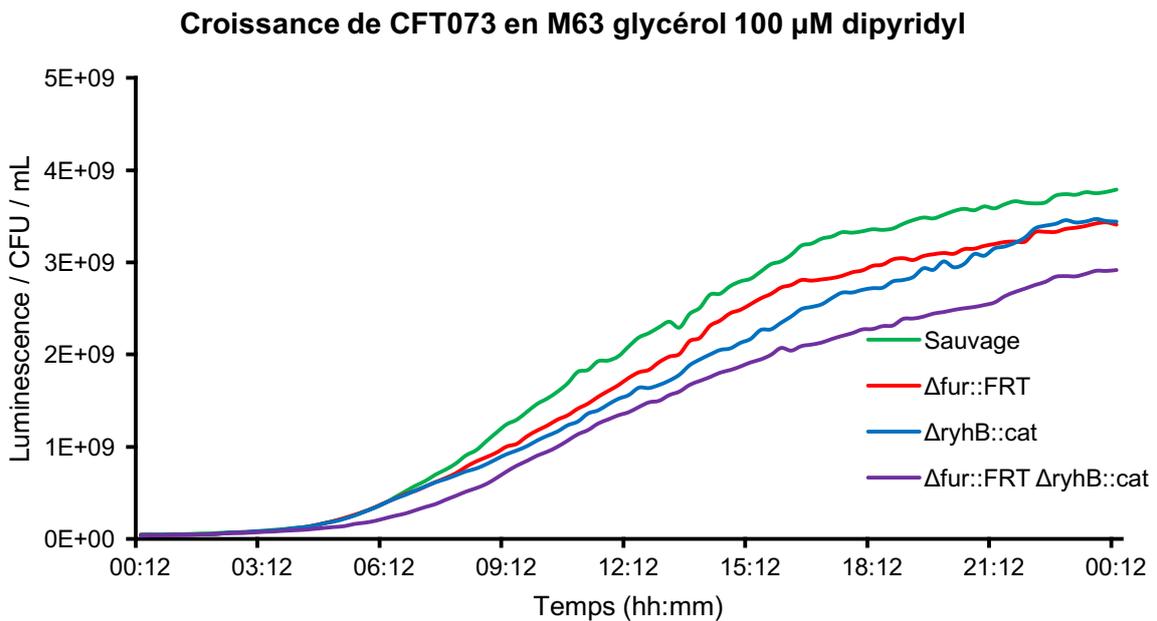


Figure S12. Croissance de CFT073 en M63 glycérol 100 μM dipyridyl. La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 15 minutes à l'aide du système Cytation. Courbes de croissance correspondant aux résultats présentés dans les figures 34 et 37.

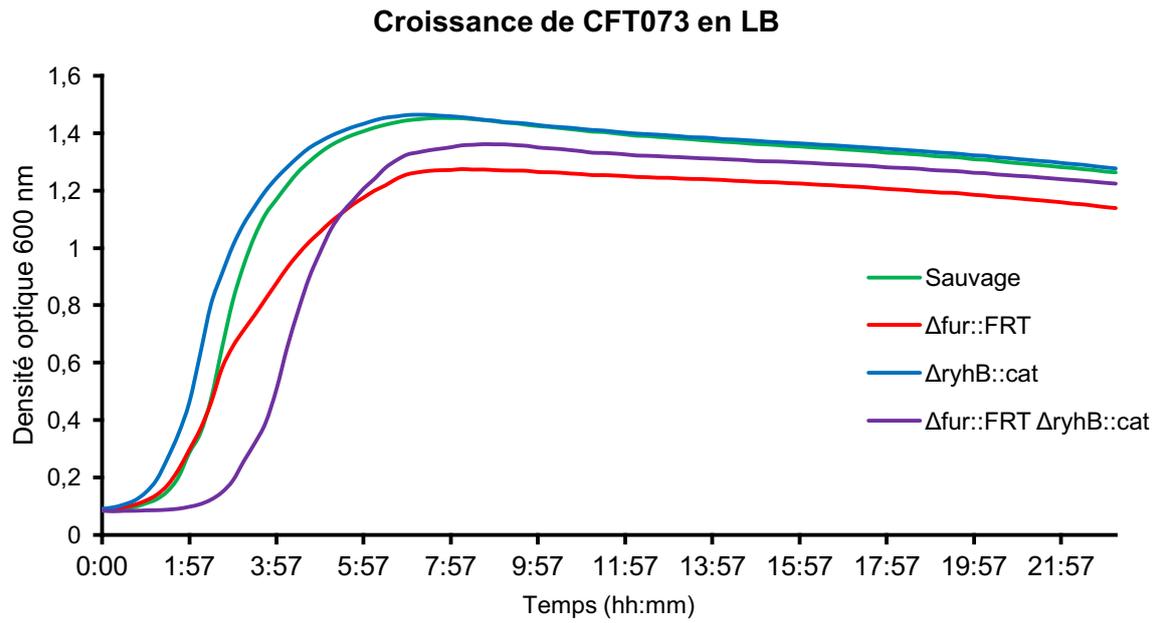


Figure S14. Croissance de CFT073 et des mutants $\Delta fur::FRT$, $\Delta ryhB::cat$ et $\Delta fur::FRT \Delta ryhB::cat$ en LB. La densité optique à 600 nm a été mesurée toutes les 15 minutes. Données non publiées obtenues par une ancienne étudiante du laboratoire.