

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

Caractérisation d'une nouvelle toxine de la famille des RTX chez *Escherichia coli*

Par Rémi Dagès

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	Eric Déziel Centre Armand Frappier – Santé Biotechnologie
Examineur externe	Marylise Duperthuy Université de Montréal
Directeur de recherche	Charles M. Dozois Centre Armand-Frappier – Santé Biotechnologie

Remerciements

Je tiens à remercier toutes les personnes qui ont contribué au succès de ma Maîtrise canadienne et qui m'ont aidé lors de la rédaction de ce rapport : Houle Sébastien, Jolivet Nicolas, Aurélie Devinck, Emilie Boutet.

Je tiens à remercier vivement directeur de maîtrise, Pr Charles M. Dozois, responsable du laboratoire de l'INRS – Institut Armand Frappier, pour son accueil, le temps passé ensemble et le partage de son expertise au quotidien, et grâce à qui j'ai pu m'accomplir dans mes missions de recherche. Il fut d'une aide précieuse dans les moments les plus délicats.

Je remercie également toute l'équipe pour leur accueil, leur esprit d'équipe et en particulier Sébastien, Katerina, Hajer, Hicham, Privil, Paula et Isabelle qui m'ont beaucoup aidé tout au long de mon stage.

Enfin, je tiens à remercier toutes les personnes qui m'ont conseillé et relu lors de la rédaction de ce mémoire : mes collègues, Aurélie Devinck, Katia Smail et Emilie Boutet.

Je remercie également beaucoup pour leur soutien Julien et Marine qui ont toujours été présents pour moi, Audrey ma Kiki, Zoé et Maxime avec qui j'ai partagé des grands moments de rire et ma famille.

Résumé

Le laboratoire de Prof. C. Dozois a identifié dans le génome d'une souche d'*Escherichia coli* pathogène aviaire, la présence d'un plasmide codant divers facteurs de virulence et une région unique, généralement absente de ce type de plasmide, codant une toxine de la famille des RTX (Repeats in Toxin), parmi d'autres gènes. Cette grande famille de toxines partage deux caractéristiques communes, la présence de répétitions riches en glycine et aspartate et la sécrétion via un système de sécrétion de type 1. Ces toxines ont une activité cytolytique en formant des pores dans les membranes de cellules cibles. Elles peuvent également lyser des érythrocytes en démontrant une activité hémolytique. La nouvelle toxine identifiée a été trouvée chez une souche d'*Escherichia coli* pathogènes aviaires (APEC) et le laboratoire a également identifié la présence de ce système chez certaines souches d'*Escherichia coli* uropathogènes (UPEC). Le système a été nommé toxine Prt (pour **P**re-**r**epeats in **t**oxin). La souche clinique ne démontre aucune zone hémolytique sur milieu de gélose au sang. Cependant, quand le système est cloné sur un plasmide multicopie, on observe une zone d'hémolyse sur gélose sang. Il est donc probable que ce système a subi une régulation négative en conditions de croissance en laboratoire. Le but du projet est d'étudier la régulation et le rôle de la toxine Prt pour la virulence de souches ExPEC (Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*).

En utilisant un modèle d'infection urinaire chez la souris et un modèle d'infection respiratoire et de septicémie chez la volaille, le but est de vérifier l'importance du système Prt pour la virulence et la colonisation dans ces modèles d'infection. L'expression des gènes *prt* a aussi été comparée entre la culture *in vitro* par rapport à l'expression *in vivo* dans les tissus des animaux infectés. De plus, le niveau d'expression ou de production de la toxine a été déterminé parmi les différentes souches ExPEC qui portent les gènes *prt*. L'analyse de production de la toxine a également été déterminée par Western blot en utilisant des anticorps spécifiques contre cette toxine.

Abstract

The laboratory of Prof. C. Dozois identified in the genome of a pathogenic avian *Escherichia coli*, strain APEC QT598, the presence of a plasmid encoding various virulence factors and a unique region, usually absent from this type of plasmid, encoding a putative RTX toxin (Repeats in Toxin), among other genes. This large family of toxins shares two common features : the presence of stretches of amino acid repeats rich in glycine and aspartate and a secretion via a type 1 secretion system. These toxins have cytolytic activity by forming pores in host cell membranes. They can also lyse erythrocytes thus demonstrating haemolytic activity. The new identified toxin was found in an APEC strain and the laboratory also identified this system in the genome of some UPEC strains. The system was named Prt toxin (for Pre-repeats in toxin). It is interesting to note that the clinical strain shows no haemolytic zone following growth on blood agar medium. However, when the system is cloned on a multicopy plasmid, there is an area of hemolysis on blood agar. It is therefore likely that this system may be subject to negative regulation under *in vitro* conditions in the laboratory or may have limited haemolytic activity. The aim of the project was to study the regulation and the role of the Prt toxin for the virulence of ExPEC.

Using a model of urinary infection in mice and a model of respiratory infection and septicemia in poultry, the goal is to verify the importance of the Prt system for virulence and colonization in these models of infection. The expression of the prt genes has also been compared between the *in vitro* culture and the *in vivo* expression in the tissues of the infected animals. In addition, the level of expression or production of the toxin has been determined among the different ExPEC strains that carry the prt genes. Production of the toxin was also determined by Western blotting using specific antibodies against this toxin.

Sommaire Récapitulatif

Escherichia coli est une bactérie commensale et membre du microbiote normal chez l'homme et d'autres animaux. Cependant, certaines souches sont pathogènes et produisent des facteurs de virulence qui contribuent aux infections entériques ou extra-intestinales. Une nouvelle région génétique localisée sur un plasmide Colicin V (CoIV), prévu pour coder pour une nouvelle toxine RTX, a été identifiée dans une souche pathogène extra-intestinale d'*E. coli* O1: K1 (QT598). Le système a été nommé Prt (prérépétitions contenant de la toxine RTX). Ces toxines forment des pores et présentent souvent une activité hémolytique. Bien que la souche QT598 ne soit pas hémolytique sur des plaques de gélose au sang, lorsqu'il est exprimé sur un plasmide, Prt a montré une activité hémolytique sur les érythrocytes de différentes espèces et des effets cytolytiques sur les fibroblastes aviaires et les macrophages humains, la vessie et les cellules rénales. Les gènes *prt* étaient présents dans 2% des APEC et 0,9% des souches UPEC testées. Cette nouvelle toxine RTX est distincte des systèmes RTX connus d'*E. coli*. De plus, la séquence de la protéine Prt n'a pas montré de forte similitude avec les systèmes RTX connus d'*E. coli* mais était plutôt plus proche des systèmes RTX de la famille des *Pasteurellaceae*. Le rôle de la toxine Prt pour la virulence des souches ExPEC a également été testé dans un modèle d'infection de poulet. Cela a été réalisé en comparant la virulence de la souche APEC O1:K1, CH138 contenant le plasmide CoIV de la souche QT598 avec ou sans délétion des gènes *prtCABD*. La perte de *prtCABD* a montré des taux de survie plus élevés au cours des 48 heures de l'infection tandis que la présence de *prtCABD* a démontré 50% de létalité chez les poussins. La perte de *prtCABD* a significativement réduit la colonisation dans les poumons, la rate et le foie ainsi que dans le sang 24 et 48 heures après l'inoculation. De plus, lors des infections de poulet, l'expression du gène *prtA* a été régulée à la hausse d'en moyenne 500 fois dans les sacs aériens par rapport à la croissance *in vitro*. Pris ensemble, ces résultats indiquent que Prt est un nouveau membre de la famille RTX qui est induit *in vivo* et qui peut contribuer à la virulence d'*E. coli* extra-intestinale.

Table des matières

Remerciements	iii
Résumé	v
Abstract	vii
Sommaire Récapitulatif	ix
Table des matières	x
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xv
Liste des abréviations	xvi
Unités de mesure	xviii
1. Introduction	1
2. Revue de littérature	3
2.1. <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1. La classification par pathotypes	3
2.1.1.1. Les InPEC	3
2.1.1.2. Les ExPEC	6
2.1.2. Infection aviaire	8
2.1.2.1. La colibacillose	8
2.1.2.2. L'aérosacculite	9
2.1.2.3. Le syndrome de la « Swollen Head »	9
2.1.2.4. Oopharites et salpingites	10
2.1.3. Infection urinaire	10
2.2. Les facteurs de virulence	12
2.2.1. Evolution et acquisition des facteurs de virulence	12
2.2.1.1. Les transferts horizontaux	12
2.2.1.2. Les îlots de pathogénicité	13
2.2.1.3. Les séquences d'insertion	14
2.2.2. Facteurs de virulence UPEC	15
2.2.2.1. Les systèmes d'acquisition du fer	15
2.2.2.2. Les flagelles	16
2.2.2.3. Les vésicules de membrane externe	17
2.2.2.4. Les Fimbriae (Pili)	18
2.2.2.5. Les adhésines non fimbriaires	19
2.2.2.6. Les toxines	19

2.2.3. Facteurs de virulence des APEC	24
2.2.3.1. Le plasmide de virulence : ColV	24
2.2.3.2. Fimbriae.....	24
2.2.3.3. Capsule.....	25
2.2.3.4. Hémagglutinine thermosensible Tsh	26
2.2.3.5. Résistance à l'effet bactéricide du sérum	26
2.3. Toxines RTX et leurs effets cytotoxiques	27
2.3.1. Les hémolysines RTX.....	33
2.3.1.1. HlyA	33
2.3.1.2. EhxA	36
2.3.1.3. TosA	38
2.3.1.4. Les toxines des <i>Pasteurellaceae</i>	38
2.3.2. Les leucotoxines.....	39
2.3.2.1. LktA et LtxA	40
2.3.2.2. CyaA.....	41
2.3.3. Les toxines MARTX.....	42
2.4. Système de sécrétion de type 1	44
2.4.1. Transporteurs ABC.....	45
2.4.2. TolC.....	47
3. Hypothèses et objectifs	49
4. Matériels et Méthodes	51
4.1. Souches bactériennes, milieux et conditions de croissance	51
4.2. Obtention des mutants	54
4.3. Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium et migration sur gel	54
4.4. Western Blot	55
4.5. Test d'hémolysé sur gélose sang	55
4.6. Test d'hémolyse en liquide.....	55
4.7. Extraction d'ARN et qRT-PCR	56
4.7.1. Extraction de l'ARN	56
4.7.2. Synthèse de l'ADNc.....	56
4.7.3. PCR quantitative.....	57
4.8. Infection de modèle aviaire	57
5. Article	59
6. Conclusion & Perspectives.....	90
Bibliographie :	93

Liste des figures

Figure 1 : Schéma des <i>Escherichia coli</i> pathogéniques intestinaux diarrhéiques.....	5
Figure 2 : Pathogénèse de l'infection du tractus urinaire par <i>Escherichia coli</i> uropathogène. Les différentes étapes présentées indiquent le déroulement d'une infection du tractus urinaire ascendante par une souche d' <i>Escherichia coli</i> uropathogène. Adapté de (Kaper, Nataro et al. 2004).....	11
Figure 3 : Résumé des voies de base de transport et de libération du fer chez les bactéries à Gram négatif.	16
Figure 4 : Toxines associées aux souches UPEC. L'a-hémolysine (HlyA), Vat, Sat et le facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF) sont codés par de nombreux isolats de souches UPEC, adapté de (Wiles, Kulesus et al. 2008).....	20
Figure 5 : Structure générale des « Serine Protease Autotransporter of <i>Enterobacteriaceae</i> » (SPATE) (Ruiz-Perez and Nataro 2014).....	22
Figure 6 : Représentation schématique de l'arrangement génétique des locus rtx d' <i>Escherichia coli</i> , de <i>Pasteurella haemolytica</i> , de <i>Bordetella pertussis</i> et de <i>Vibrio cholerae</i> . Structures de domaine des cytotoxines RTX HlyA (<i>E. coli</i>), LktA (<i>P. haemolytica</i>), CyaA (<i>B. pertussis</i>) et MARTXVc (<i>V. cholerae</i>) avec indication des sites de modification post-traductionnelle des lysines internes par fixation covalente de résidus d'acyle. Adapté de (Linhartová, Bumba et al. 2010)..	28
Figure 7 : Schéma de l'organisation de l'export de protéines d'un système de sécrétion de type 1 (SST1). Adapté de (Linhartová, Bumba et al. 2010).	29
Figure 8 : Résumé de l'organisation des toxines de la famille des RTX et leurs fonctions. Adapté de (Wiles and Mulvey 2013).	29
Figure 9 : Modèle d'activité cytotoxique de la toxine HlyA dans les tissus infectés (vessie, reins, ...). Adapté de (Ristow, Tran et al. 2019).....	36
Figure 10 : Sécrétion et association de EhxA (EHEC-Hly) avec les OMV (Bielaszewska, Aldick et al. 2014).	37
Figure 11 : Structure des transporteurs ABC. Adapté de (Cuthbertson, Kos et al. 2010).	47
Figure 12 : Vue d'ensemble de la structure de TolC. Adapté de (Hotz 2008).....	48
Figure 13 : Region containing the Pre-repeats in toxin (Prt) genes within the enhanced virulence island of ColV-type plasmid pEC598.	64
Figure 14 : Phylogenetic tree demonstrating relatedness among RTX toxins for the 4 protein sequences of the operon <i>prtCABD</i>	65
Figure 15 : Detection of PrtA in culture supernatant fluids by western blotting.....	66
Figure 16 : Screening of several RTX protein sequence in different bacteria for the location of the nonapeptide consensus sequence GGXGXDX[L/I/V/W/Y/F]X, where X can be any amino acid. .68	
Figure 17 : Growth of <i>E. coli</i> on sheep agar plate supplemented with CaCl ₂ (10mM).	69

Figure 18 : Hemolytic activity of the *prtA* gene from a multicopy plasmid and the known *hlyA* gene. 70

Figure 19 : The cytopathic effects of PrtA from strain QT598 on CEC-32 avian fibroblasts and human macrophages in culture. 71

Figure 20 : Survival rates of the chickens during the 48 hours of infection..... 73

Figure 21 : Role of the Prt toxin for *E. coli* CH138 in the avian model of aeriian sac infection..... 74

Figure 22 : : Weight differences between chickens (n = 6-13) before and after the infections.... 75

Figure 23 : Differential expression of *prtA* gene occurs in vitro and in chicken tissues..... 76

Liste des tableaux

Tableau I : Différents membres de la famille des RTX (Welch 2001, Bielaszewska, Aldick et al. 2014, Bárcena-Uribarri, Benz et al. 2015).....	30
Tableau II : Liste des souches utilisées ainsi que leur résistance aux antibiotiques.....	51
Tableau III : Liste des amorces utilisées.....	53
Table IV : The cytopathic effects of PrtA from strain QT598 on different kind of cells	71
Table V : Production of lesions in air sacs and extra-respiratory organs of chickens inoculated with APEC strains CH138 (pEC598), the isogenic CH138 (pEC598) Δ prt mutant and the complemented mutant.....	75
Table VI : Bacterial strains and plasmids used in this study.....	79
Table VII : Primers used in this study	81

Liste des abréviations

A/E : « Attachante et Effaçante »
ABC : « ATP Binding Cassette »
ABU : Bactériurie Asymptomatique
AC : Adénylate cyclase
APEC : *Escherichia coli* Pathogène Aviaire
APV : Pneumovirus Aviaire
BAS : Bactériurie Asymptomatique
BHE : Barrière Hématoencéphalique
CNF1 : Facteur Nécrosant Cytotoxique 1
CPD : Cystéine Protéase à Auto-traitement
DAEC : *Escherichia coli* à Adhérence Diffuse
EAEC : *Escherichia coli* EntéroAggrégative
EHEC : *Escherichia coli* EntéroHémorragique
EIEC : *Escherichia coli* EntéroInvasive
EPEC : *Escherichia coli* EntéroPathogène
ETEC : *Escherichia coli* EntéroToxigénique
ExPEC : *Escherichia coli* Pathogène Extra-intestinal
HUS : Syndrome Hémorragique Urémique
InPEC : *Escherichia coli* Pathogène Intestinal
IS : « Insertion Sequence »
ITU : Infection du Tractus Urinaire
LEE : Locus d'Effacement des Entérocytes
LPS : Lipopolysaccharide
LT : Enterotoxine thermolabile
MARTX : « Multifunctional Autoprocessing RTX toxins »
MFP : Protéine de Fusion Membranaire
NBD : Domaines de Liaison Nucléotidique
NMEC : *Escherichia coli* de la Méningite Néonatale
OMV : Vésicules de la Membrane Externe
PAI : îlot de pathogénicité
PAI-IICFT073 : îlot de pathogénicité II chromosomique de CFT073
PBP : Protéines de liaison périplasmique
PCR : « Polymerase Chain Reaction »

RTX : « Repeats in Toxins »

SEPEC : « Sepsis associated Pathogenic *E. coli* »

SPATE : Sérine Protéase Autoporteur des *Enterobacteriaceae*

SREBP : « Sterol Regulatory Element Binding Protein »

SST1 : Système de sécrétion de type 1

ST : Enterotoxine thermostable

STEC : *Escherichia coli* avec Shiga Toxines

TCA : Acide trichloroacétique

TMD : Domaines Transmembranaires

UPEC : *Escherichia coli* Pathogène Urinaire

Vat : cytotoxine autporteur vacuolante

Unités de mesure

Da : Dalton

Kb : Kilobase

Kd : Constante de dissociation

kDa : KiloDalton

MDa : MegaDalton

M : Molaire

mM : Milli molaire

mL : millilitre

nm : Nanomètre

pb : Paires de bases

FCR: « Relative centrifugal force »

UFC : Unité Formant Colonies

µg : microgramme

µL : microlitre

µm : micromètre

µM : micromolaire

1. Introduction

Escherichia coli est l'un des organismes modèles les mieux caractérisés et peut être à la fois une bactérie commensale et un pathogène polyvalent associé aux infections intestinales et extra-intestinales (Croxen and Finlay 2010). Les *E. coli* pathogènes peuvent être divisés en deux groupes, les *E. coli* pathogènes intestinales provoquant des infections intestinales et les *E. coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC) qui peuvent infecter plusieurs organes (Kaper, Nataro et al. 2004). Parmi les ExPEC, les souches sont classées par pathotypes en fonction du tropisme cellulaire, de l'hôte infecté et du mode d'infection et sont divisées en quatre groupes principaux, les *E. coli* associées à la méningite néonatale (NMEC), les *E. coli* associées à la septicémie (SEPEC), les *E. coli* uropathogènes (UPEC) et les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) (Johnson and Russo 2002, Kaper, Nataro et al. 2004, Clermont, Olier et al. 2011). Les APEC provoquent de graves maladies respiratoires et systémiques chez les poulets, communément appelées colibacillose. La colibacillose aviaire entraîne des pertes économiques importantes en raison de la baisse des taux d'éclosion ou de la production d'œufs, de la mortalité dans les troupeaux de volailles et est également très coûteuse en coûts de traitement (Guabiraba and Schouler 2015).

Les génomes de plusieurs souches APEC et leurs plasmides de virulence ont été séquencés et partagent des similitudes avec certains isolats ExPEC humains et leurs plasmides (Johnson 1991, Johnson and Nolan 2009, Dziva, Hauser et al. 2013, Dale and Woodford 2015). Les ExPEC sont connues pour leur évolution rapide et sont de ce fait en constante évolution. La plasticité du génome bactérien a permis à *E. coli* d'échanger, de gagner ou de perdre du matériel génétique différent et a conduit au transfert d'une diversité de gènes qui codent la virulence ou les propriétés de « *fitness* » sur des éléments génétiques mobiles, tels que les plasmides, les transposons, les bactériophages ou îlots de pathogénicité (Bergthorsson and Ochman 1998). Les souches APEC et UPEC partagent certains facteurs de virulence qui aident à surmonter les défenses de l'hôte et favorisent la colonisation ou l'invasion des voies urinaires ou l'infection systémique de la volaille (Johnson 1991). Il s'agit notamment des systèmes d'acquisition du fer, des protéines d'auto-transporteur (AT), des fimbriae, des antigènes O et K, des systèmes de sécrétion et des toxines (Dho-Moulin and Fairbrother 1999, Johnson and Russo 2002, Kaper, Nataro et al. 2004, Dziva and Stevens 2008, Croxen and Finlay 2010). La plupart des souches APEC contiennent des plasmides de type colicine V conjugative (ColV) ou des plasmides similaires qui codent pour plusieurs gènes de virulence qui contribuent à la virulence chez la volaille (Dozois, Dho-Moulin et al. 2000, Dozois, Daigle et al. 2003, Mellata, Dho-Moulin et al. 2003) et aux infections des voies urinaires ou aux infections systémiques dans les modèles murins

(Johnson, Johnson et al. 2006, Ewers, Li et al. 2007, Terlizzi, Gribaudo et al. 2017, Habouria, Pokharel et al. 2019). Nous avons identifié au sein du laboratoire une région distincte du plasmide ColV dans une souche APEC O1:K1, QT598, qui contient 3 facteurs de virulence putatifs distincts: un système fimbriaire, un autotransporteur de sérine protéase et une nouvelle toxine RTX. Cette région unique sur le plasmide ColV contribue à la virulence et à la létalité des poussins et en tant que telle, nous l'avons appelée « *Enhanced Virulence Island* » (EVI).

Parmi les facteurs de virulence des *E. coli* pathogènes, les toxines RTX (*Repeats in Toxin*) sont membres d'une famille de protéines synthétisées par une gamme de bactéries pathogènes à Gram négatif et ont deux caractéristiques communes : la présence de répétitions riches en glycine et en aspartate et la sécrétion via un système de sécrétion de type 1 (SST1) (Welch 2001). Les membres de la famille RTX comprennent les toxines cytolytiques, les métalloprotéases et les lipases (Frey and Kuhnert 2002). Ces toxines ont toutes une organisation génique commune et des caractéristiques structurales distinctes. Bien qu'il existe des variations, l'opéron générique de la toxine RTX se compose de quatre gènes qui sont désignés *rtxC*, *A*, *B* et *D* dans l'ordre de transcription (Stanley, Packman et al. 1994, Linhartová, Bumba et al. 2010). Le gène *rtxA* code pour le précurseur de la protéine toxine, RtxC est une acétyl transférase, et RtxB et D constituent le système d'exportation pour la sécrétion de la toxine (Stanley, Packman et al. 1994). Les toxines RTX nécessitent une modification post-traductionnelle par leur acétyl transférase pour devenir biologiquement actives (Welch 2001, Linhartová, Bumba et al. 2010, Wiles and Mulvey 2013).

Parmi les *E. coli* pathogènes, les deux toxines RTX cytolytiques qui sont le mieux connues sont les toxines Hly et Ehx trouvées respectivement chez les ExPEC et certaines *E. coli* Shiga-toxinogène/entérohémorragique (Bauer and Welch 1996, Wiles and Mulvey 2013). Cependant, la présence de telles hémolysines ou toxines RTX est rare chez les APEC. La région EVI du plasmide APEC ColV pEC598 contient un nouveau système RTX que nous avons nommé Prt pour les pré-répétitions présentes au niveau de la protéine *PrtA* ainsi que par le fait qu'elle n'a pas encore été caractérisée (Habouria, Pokharel et al. 2019).

Dans cette étude, nous avons caractérisé la toxine Prt, déterminé sa prévalence parmi les isolats des voies urinaires aviaires et humaines, ainsi que parmi les bases de données de séquences de génomes bactériens. Nous avons également déterminé son activité hémolytique et cytotoxique et étudié le rôle de cette toxine pour la virulence et la colonisation du poulet dans un modèle d'infection des voies respiratoires.

2. Revue de littérature

2.1. Escherichia coli

Escherichia coli est un des organismes les mieux caractérisés : c'est un bacille de type Gram négatif, non sporulant, anaérobie facultatif qui appartient à la famille des *Enterobacteriaceae*. La souche de référence, *Escherichia coli* K-12 et ses dérivés ont été les clés dans l'avancement des connaissances en biologie moléculaire, physiologique et biochimique. Cette espèce a la caractéristique d'être à la fois une des bactéries commensales de l'intestin des vertébrés mais également un pathogène versatile, qui infecte plus de 2 millions d'humains chaque année en causant des maladies entériques et extra-intestinales (Kosek, Bern et al. 2003).

Les souches pathogènes sont différentes des souches commensales car ces premières ont acquis différents facteurs de virulence permettant leur adaptation à de nouvelles niches écologiques, ce qui leur permet également de causer une infection. Les *E. coli* pathogènes sont divisées en deux groupes, les pathotypes intestinaux (InPEC) causant des infections intestinales et les pathotypes extra-intestinaux (ExPEC) pouvant infecter plusieurs organes. La taille du génome des souches pathogènes est typiquement plus grande que les souches non-pathogènes, notamment à cause de la présence des gènes de virulence (Welch, Burland et al. 2002).

2.1.1. La classification par pathotypes

Les *Escherichia coli* qui ont acquis des facteurs de virulence, ont ainsi pu acquérir une capacité accrue à s'adapter à de nouvelles niches et leur permet de causer un large spectre de maladies. Ces facteurs de virulence sont souvent codés par des éléments génétiques qui peuvent se retrouver et être mobilisés chez différentes souches afin de créer de nouvelles combinaisons de facteurs de virulence. Seules les meilleures combinaisons de facteurs de virulence persistent et deviennent des pathotypes d'*E. coli* qui sont capables de causer des maladies chez des individus sains. La classification par pathotypes est basée sur le tropisme cellulaire, l'hôte infecté ainsi que le mode d'infection et se divise en deux familles, les souches causant des infections intestinales, les InPEC, et les souches causant des infections extra-intestinales, les ExPEC (Kaper, Nataro et al. 2004).

2.1.1.1. Les InPEC

Les *E. coli* de cette famille sont généralement divisés en 6 pathotypes en fonction de leurs profils de pathogénicité (facteurs de virulence, maladies cliniques et profil phylogénétique) (Figure 1) :

Les *E. coli* entéro-pathogéniques (EPEC) causent des diarrhées chez majoritairement les jeunes enfants. Ces souches sont caractérisées par leur capacité à produire des lésions attachantes effaçantes (A/E) (Knutton, Baldwin et al. 1993). La bactérie s'attache à la membrane de la cellule de l'hôte ce qui provoque une perturbation à la surface de la cellule qui mène à l'effacement des microvillosités. L'effacement de ces microvillosités entraîne aussi une accumulation d'actine polymérisée sous le site d'attachement à la membrane. C'est au niveau d'un îlot de pathogénicité appelé locus d'effacement des entérocytes (LEE) que ces éléments génétiques nécessaires pour la formation de lésions A/E sont produits (Ochoa and Contreras 2011). Le locus LEE possède des gènes codant pour une adhésine de membrane externe (intimine), la machinerie de système de sécrétion de type 3 (protéines Esc et Sep), des chaperonnes (protéines Ces), des translocateurs (EspA, EspB et EspD), des protéines effectrices (EspF, EspG, EspH, Map et EspZ), un récepteur d'intimine transloqué (Tir), des protéines régulatrices Ler, GrlR (régulateur global des protéines LEE et répresseurs) et GrlA (régulateur global des protéines LEE et activateur)

Les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC) sont des pathogènes des humains qui causent des syndromes hémolytiques urémiques (HUS) ainsi que des diarrhées hémorragiques (Sperandio and Nguyen 2012). Le sérotype O157:H7 est bien connu pour être impliqué dans des épidémies alimentaires et hydriques mondiales. Ces souches forment des lésions A/E (toujours codées par le locus LEE) au niveau de la jonction recto-anale mais produisent également des shiga-toxines (Stx). Ces shiga-toxines sont les facteurs de virulence qui différencient les EHEC des EPEC.

Les *E. coli* entéroinvasives (EIEC), quant à elles, provoquent des maladies intestinales indissociables de celles causées par *Shigella*, en envahissant les muqueuses coliques humaines. Chez les humains, elles peuvent provoquer des dysenteries et sont étroitement liées aux *Shigella* de par leurs facteurs de virulence et d'autres propriétés phénotypiques (Beutin, Gleier et al. 1997). La pathogenèse de ces infections implique la pénétration des cellules épithéliales coliques, suivi d'une transcytose à travers les cellules M, la lyse des vacuoles endocytiques, la multiplication intracellulaire et la propagation aux cellules épithéliales adjacentes (Nataro and Kaper 1998, Michelacci, Prosseda et al. 2016).

Les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC) provoquent des diarrhées, principalement chez les enfants dans les pays en voie de développement. Ces souches sont également retrouvées chez les personnes voyageant dans des pays moins développés (Mathewson, Jiang et al. 1995, Okhuysen and DuPont 2010). Les EAEC sont caractérisés pour leur modèle d'adhérence agrégative en forme de « mur de brique » au niveau de cellules HEp2, aussi appelées lignée cellulaire HeLa (Aslani, Alikhani et al. 2011).

Les infections par des *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont caractérisées par des nausées, des malaises, des vomissements et causent des diarrhées non sanglantes accompagnées de pas ou peu de fièvre. Après la colonisation de l'intestin par les ETEC, les bactéries vont produire, à l'aide de plasmides, des facteurs de virulence, dont 2 entérotoxines diarrhétiques : une entérotoxine thermolabile (LT) et une entérotoxine thermostable (ST). La plupart des diarrhées causées par des ETEC sont dues à la présence de ces entérotoxines (Evans Jr and Evans 1996).

Les Diffusely Adherent *E. coli* (DAEC) sont des bactéries qui colonisent le petit intestin et qui causent des diarrhées chez les enfants entre 18 mois et 5 ans, mais causent également des infections urinaires récurrentes chez les adultes. Les DAEC produisent des motifs d'adhérence diffus sur les cellules HeLa et HEp-2, ce motif est médié grâce à des protéines codées par une famille d'opéron connexe (Croxen and Finlay 2010).

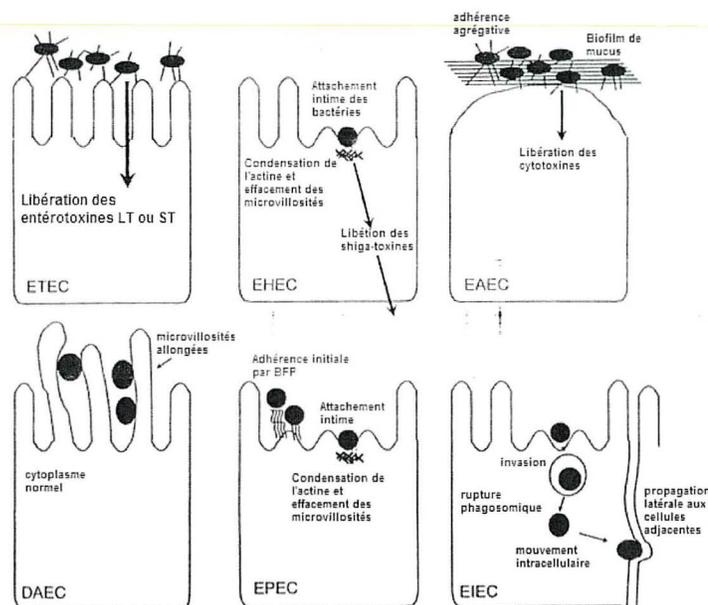


Figure 1 : Schéma des *Escherichia coli* pathogéniques intestinaux diarrhéiques.

Les 6 catégories diarrhéiques présentent des interactions spécifiques avec les cellules eucaryotes. Voici schématiquement, les interactions pour chaque pathotype avec leur cellule cible. Adapté de (Nataro and Kaper 1998).

2.1.1.2. Les ExPEC

Les *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) sont des pathogènes retrouvés communément chez les animaux et les humains. Ces dernières années, ces ExPEC ont été responsables de nombreuses maladies, ce qui a eu pour conséquence une augmentation des charges économiques et sanitaires de la société (Cunha, Saidenberg et al. 2017). Ces souches ExPEC causent des infections du tractus urinaire (ITUs), des méningites et des bactériémies. Les ExPEC sont divisés en 4 pathotypes : « neonatal meningitis associated *E. coli* » (NMEC), « sepsis associated *E. coli* » (SEPEC), « uropathogenic *E. coli* » (UPEC) et « avian pathogenic *E. coli* » (APEC).

Les NMEC :

Les NMEC sont associés avec des cas de méningites chez les nouveau-nés, car ce pathotype a la capacité de survivre dans le sang et d'envahir les méninges des enfants. Les NMEC provoquent les infections qui ont le plus haut taux de mortalité et de morbidité (10-30%) durant la période néonatale (Kim 2003). Chez 25 à 50% des survivants, les NMEC entraînent la surdité, la cécité, la paralysie cérébrale, les convulsions, l'hydrocéphalie ou la déficience cognitive. L'infection néonatale se produit principalement quand les micro-organismes sont transférés du vagin au liquide amniotique lors de l'accouchement ou de la rupture des membranes pendant l'accouchement. Les bactéries peuvent traverser la barrière hématoencéphalique grâce à différents mécanismes : par voie transcellulaire ou paracellulaire et chez les phagocytes infectés. Le passage transcellulaire se produit lorsque les micro-organismes pénètrent les cellules sans qu'il n'y ait de rupture des jonctions serrées intracellulaire (Barichello, Fagundes et al. 2013).

Les SEPEC :

La septicémie bactérienne est une maladie où des bactéries envahissent la circulation sanguine et infectent plusieurs organes. Dans ces cas, *E. coli* est le microorganisme le plus fréquemment isolé du sang du patient. Bien que le nombre de bactériémies et de septicémies dues à *E. coli* ait augmenté (McBean and Rajamani 2001, Martínez, Soto et al. 2006), il existe peu de détails sur les mécanismes de la pathog nese des SEPEC. Les *E. coli* associés au sepsis (SEPEC) sont phylogénétiquement et épidémiologiquement différents des *E. coli* pathogènes intestinaux et des *E. coli* commensales, qui font partie du microbiote humain. Une variété de facteurs de virulence liés aux SEPEC humaines comprend des toxines sécrétées telles que HlyA (α -hémolysine), Sat (*secreted autotransporter toxin*) et CNF-1 (*cytotoxic necrotising factor 1*) (Pitout 2012) . Ces toxines peuvent modifier la forme et/ou la fonction de la cellule hôte, contribuant ainsi aux processus biologiques stimulés par l'agent pathogène. Malgré leur

importance médicale, les SEPEC ont un pathotype peu étudié et le mécanisme permettant de traverser la barrière endothéliale et d'accéder à la circulation sanguine est encore inconnu.

Les UPEC :

Les infections des voies urinaires (ITU : Urinary Tract Infection) sont les infections bactériennes les plus courantes et sont responsables d'une morbidité et d'une mortalité majeures, entraînant une augmentation des coûts de soins de santé. La plupart des infections urinaires sont causées par des souches d'*E. coli* spécialisées, appelées *E. coli* uropathogènes (UPEC). Les infections urinaires sont classées en catégories de maladies en fonction du site d'infection : cystite (vessie), pyélonéphrite (rein) et bactériurie (urine). Les bactéries peuvent également être détectées à des concentrations élevées dans les voies urinaires, mais les personnes chez qui ces taux élevés sont détectés ne présentent aucun symptôme. Cette affection est appelée bactériurie asymptomatique (ABU) (Foxman 2002). Une infection réussie par des agents pathogènes bactériens nécessite l'adhésion aux cellules hôtes, la colonisation des tissus et, dans certains cas, une invasion cellulaire, suivie d'une multiplication intracellulaire, et d'une dissémination vers d'autres tissus ou d'une persistance.

Une infection urinaire est définie par la présence d'un nombre significatif d'organismes pathogènes dans le système urinaire. Si des symptômes, tels que des mictions douloureuses ou fréquentes ou du sang dans l'urine sont présents, une centaine de bactéries uropathogènes par millilitre d'urine peut être considérée comme significative (Stamm 1982). Les bactéries peuvent être détectées à des concentrations élevées dans les voies urinaires chez les individus lors d'un examen d'urine de routine.

Alors que la cystite chez un individu en bonne santé se résorbe généralement sans séquelles, la pyélonéphrite peut entraîner une morbidité grave et peut être fatale. Les patients présentant des voies urinaires anormales ou obstruées ou dont le système immunitaire est compromis courent un risque élevé de contracter une infection urinaire. Ces infections sont souvent qualifiées d'infections du tractus urinaire compliquées. Il existe un fort risque dans ce groupe qu'une simple infection des voies urinaires devienne une infection systémique.

Les APEC :

Bien qu'*Escherichia coli* soit présent dans la microflore normale du tractus intestinal et des autres muqueuses de l'hôte et dans l'environnement des oiseaux, seules certaines de ces souches possédant des attributs de virulence spécifiques, appelées *E. coli* pathogènes pour

l'aviaire (APEC), peuvent causer la maladie. Les APEC provoquent des maladies respiratoires et systémiques graves chez les poulets, couramment appelées colibacillose. Les APEC ont des coûts économiques et sociaux considérables pour les producteurs de volaille du monde entier, avec des pertes dues à la mortalité précoce, à la condamnation des carcasses et à une productivité réduite (Dho-Moulin and Fairbrother 1999). Les APEC infectent les poulets et les poules pondeuses, en particulier au début de la maturité sexuelle et pendant les pontes intenses (Gross 1991, Guabiraba and Schouler 2015).

Les *E. coli* pathogènes aviaires provoquent des infections extra-intestinales systémiques telles que des aérosacculites, des polysérosites et des septicémies chez les poulets, les dindons et d'autres hôtes aviaires. Les APEC se trouvent généralement dans le microbiote intestinal d'oiseaux en bonne santé et les infections résultent d'une exposition environnementale et d'une sensibilité accrue de l'hôte (Dho-Moulin and Fairbrother 1999). Le contenu du génome, les profils des gènes de virulence, la phylogénie, la formation de biofilms et l'activation transcriptionnelle *in vivo* ont été démontrés pour être partagés par les souches APEC et ExPEC humaines (sérotypes ExPEC O18:K1:H7, O78 et O2:K1:H7) (Bauchart, Germon et al. 2010). D'autres études expérimentales sur la pathogenèse *in vivo* et *in vitro* ont montré que les APEC peuvent causer des maladies chez les hôtes mammifères, et des similitudes entre la transcription des gènes de virulence entre les APEC et les ExPEC, suggèrent le potentiel zoonotique de l'APEC (Zhao, Gao et al. 2009).

2.1.2. Infection aviaire

Les APEC sont principalement associées aux infections des tissus extra-intestinaux chez les poulets, les dindons, les canards et d'autres espèces aviaires. Les infections du sac vitellin sont le plus souvent observées vers la fin de la période d'incubation de l'œuf, généralement après une contamination fécale de la surface de l'œuf. Ils entraînent souvent une mortalité embryonnaire ou la mort des jeunes oiseaux jusqu'à 3 semaines après l'éclosion. On observe souvent une rétention du sac vitellin infecté et de l'omphalite. Le syndrome de la maladie la plus importante associée à l'APEC commence par une infection des voies respiratoires et peut être appelé aérosacculite ou maladie des sacs aériens (Gross 1991, Gross 1994).

2.1.2.1. La colibacillose

Bien que connue depuis plus d'un siècle, la colibacillose aviaire reste l'une des principales maladies endémiques de l'industrie de la volaille dans le monde. Les bactéries autologues offrent

une protection limitée spécifique au sérotype, mais plusieurs sérogroupes sont associés à la maladie, en particulier les O1, O2 et O78, parmi bien d'autres. La colibacillose est une maladie d'importance économique grave pour tous les producteurs de volaille du monde et se caractérise par un large éventail de lésions (La Ragione and Woodward 2002). Selon le statut de virulence de la souche, le statut de l'hôte, la présence et le type de facteurs prédisposants, l'infection se manifeste par une septicémie initiale suivie d'une mort subite ou d'une inflammation localisée dans plusieurs organes. Les lésions les plus courantes associées à la colibacillose sont les périhépatites, les aérosacculites et les péricardites, bien que d'autres syndromes tels que la péritonite de l'œuf, la salpingite, le coligranulome, l'omphlite, la cellulite et l'ostéomyélite / arthrite puissent être rencontrés (Barnes 1997).

2.1.2.2. L'aérosacculite

Les sacs aériens font partie intégrante du système respiratoire du poulet. Les poulets ont neuf sacs aériens, qui sont des poches ressemblant à des bulles à parois minces qui fonctionnent comme un système permettant à l'oxygène de circuler dans leur corps. Lorsque les sacs aériens de poulet deviennent enflammés, ils s'épaississent et accumulent des matières purulentes ou caséuses dans leur cavité, on parle alors d'aérosacculite (Dho-Moulin and Fairbrother 1999).

L'aérosacculite est une maladie respiratoire aussi connue sous le nom de maladie respiratoire chronique ou de maladies respiratoires complexes. Une manifestation aussi importante que l'aérosacculite fait généralement suite à une infection virale ayant permis une infection bactérienne secondaire. Les pathogènes le plus fréquemment en cause sont *E. coli* et *Mycoplasma gallisepticum*, mais plusieurs virus y sont aussi souvent associés : la bronchite infectieuse, la laryngotrachéite infectieuse, l'influenza aviaire, la maladie de Newcastle, ... (Ficken and Barnes 1989, Dho-Moulin and Fairbrother 1999).

2.1.2.3. Le syndrome de la « Swollen Head »

Ce syndrome est une infection compliquée chez les poulets de chair et les reproducteurs, où l'agent étiologique primaire est un pneumovirus aviaire (APV) et l'agent secondaire est habituellement *E. coli*. Ce syndrome se caractérise par des signes respiratoires et nerveux et est caractérisé par une inflammation aiguë à subaiguë des cellules de la peau et du tissu sous-cutané de la tête et des régions périorbitaires. Après une infection par cette maladie, la morbidité est souvent faible (1 %), mais les animaux présentant les symptômes meurent dans la majorité des

cas (Parreira, Arns et al. 1998). Les lésions que cette maladie engendre sont l'apparition d'œdème au niveau de la tête et de la région périorbitaire, ainsi que d'un exsudat caséux dans le tissu conjonctif au même niveau et au niveau des glandes lacrymales (Pattison, Chettle et al. 1989).

2.1.2.4. Oopharites et salpingites

Cette maladie, le plus souvent chronique, apparaît lorsque le sac aérien abdominal gauche est atteint par des *E. coli*. Les bactéries se propagent alors, par contiguïté de tissu, pour atteindre l'oviducte et y persister quelque temps. Les animaux malades meurent dans les 6 mois suivant l'infection (Gross 1994). Ces troubles du tractus génital peuvent être soit la conséquence d'une infection par voie ascendante consécutive à une insémination artificielle, soit associés à des lésions de péritonite et/ou d'impaction de l'oviducte. Cette maladie mène le plus souvent à une salpingite et la perte de la capacité de ponte d'œuf ou à une infection de la cavité péritonéale causant une péritonite et la mort de la poule (La Ragione and Woodward 2002).

2.1.3. Infection urinaire

Une ITU est une infection qui affecte une partie des voies urinaires. Lorsqu'elle affecte les voies urinaires inférieures, on parle d'infection de la vessie (cystite) et lorsqu'elle affecte les voies urinaires supérieures, on parle d'infection des reins (pyélonéphrite). Les symptômes provenant des voies urinaires inférieures incluent douleur, généralement en plus des symptômes d'une infection urinaire inférieure, il y a de la fièvre et des douleurs au flanc. Chez les très vieux comme chez les très jeunes, les symptômes peuvent être vagues ou non spécifiques. Il existe trois types d'ITU, soit les bactériuries asymptomatiques (BAS), les ITU symptomatiques sans complications et les ITU symptomatiques avec complications.

La bactériurie asymptomatique est caractérisée par un manque apparent de symptômes. Elle est définie cliniquement par la présence d'au moins 10^5 UFC/mL d'un ou plusieurs organismes sur deux échantillons d'urine consécutifs et par l'absence de symptômes attribuables à une infection urinaire (Warren, Tenney et al. 1982).

L'ITU symptomatique quant à elle est définie comme l'invasion bactérienne des voies urinaires, qui peut survenir n'importe où entre l'urètre et les reins et est l'une des infections bactériennes les plus courantes. Le plus souvent les bactéries infectent l'urètre et remontent vers la vessie et les reins (infection ascendante). Ce processus se déroule en 5 étapes majeures présentées en figure 2. Premièrement, il y a contamination de l'air périurétrale par une souche

UPEC de la flore intestinale ou vaginale et migration le long de l'urètre jusqu'à la vessie, où les bactéries s'attacheront à l'urothélium par le biais des fimbriae de type 1 (Kaper, Nataro et al. 2004, Lane, Alteri et al. 2007). Cette liaison peut induire l'exfoliation et l'apoptose des cellules épithéliales qui réagissent pour se défendre (Mulvey, Lopez-Boado et al. 1998). La deuxième étape est la multiplication et l'envahissement de la vessie au point de provoquer une cystite, caractérisée par l'inflammation de l'organe, la présence de bactéries dans l'urine, la difficulté de produire une miction et la présence de sang, dans certains cas (Mulvey, Lopez-Boado et al. 1998, Lane, Alteri et al. 2007). Troisièmement, les bactéries se déplacent, via les flagelles, vers les reins et, quatrièmement, il y a colonisation des reins où la fixation aux cellules rénales est médiée par les fimbriae P. Une pyélonéphrite se développe avec une fièvre, des vomissements et douleurs aux flancs. Cinquièmement, si l'infection n'est pas traitée, il y aura endommagement aux reins et passage des bactéries à la circulation sanguine, entraînant une septicémie (Kaper, Nataro et al. 2004, Lane, Alteri et al. 2007). Mais les bactéries peuvent aussi infecter le tractus urinaire habituellement stérile en se déplaçant du flux sanguin jusqu'aux reins (propagation hémotogène) (Cruz, Figueiredo et al. 2019, Tang, Quanstrom et al. 2019).

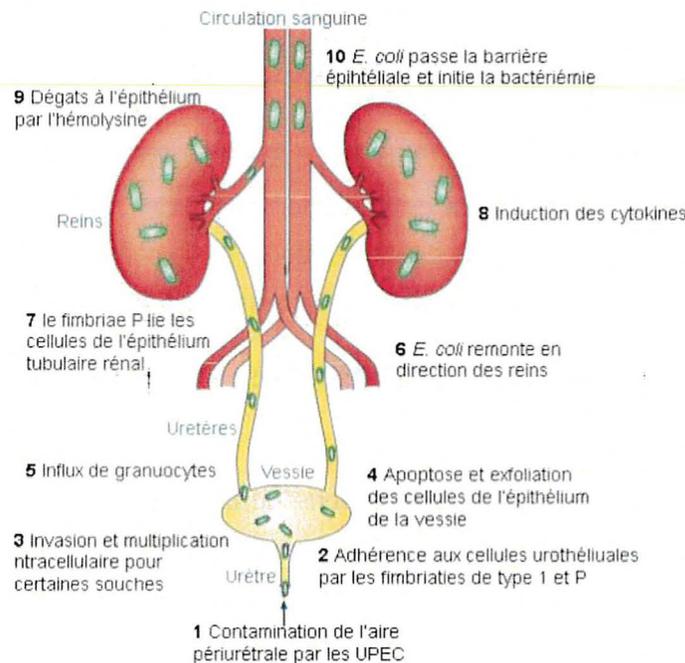


Figure 2 : Pathogenèse de l'infection du tractus urinaire par *Escherichia coli* uropathogène. Les différentes étapes présentées indiquent le déroulement d'une infection du tractus urinaire ascendante par une souche d'*Escherichia coli* uropathogène. Adapté de (Kaper, Nataro et al. 2004).

2.2. Les facteurs de virulence

Les souches pathogènes d'*Escherichia coli* se caractérisent par l'expression de propriétés, produits ou structures bactériennes distinctives, appelés facteurs de virulence, car ils aident l'organisme à surmonter les défenses de l'hôte et à coloniser ou envahir les voies urinaires (Johnson 1991).

Les souches d'*E. coli* pathogènes sont en constante évolution et ceci est la conséquence de l'évolution très rapide, à notre échelle de temps, du monde bactérien, et de la plasticité du génome des bactéries. En particulier pour *E. coli*, la plasticité du génome bactérien permet des échanges permanents de matériel génétique, et aussi à la présence de nombreux gènes qui codent pour ces propriétés de virulence sur des structures génétiques mobiles, comme des plasmides, des transposons, des phages, des bactériophages ou des îlots de pathogénicité (Bergthorsson and Ochman 1998). Ces facteurs de virulence donnent ainsi aux bactéries une meilleure capacité à coloniser et envahir des organes dans lesquelles leurs croissances ne sont pas favorables.

Un gène de virulence doit répondre au postulat moléculaire de Koch, c'est-à-dire que le gène doit être associé à un trait de virulence, l'absence du gène doit réduire la virulence, et, finalement, la réintroduction du gène doit restaurer la virulence perdue (Waters and Crosa 1991).

2.2.1. Evolution et acquisition des facteurs de virulence

Les modèles actuels d'évolution bactériens suggèrent que la diversité des pathogènes est le résultat de plusieurs mécanismes. Cela peut être le résultat de l'acquisition de gènes aidant dans la pathogénicité lors de transferts de gènes horizontaux successifs, soit par transfert d'îlots de pathogénicité ou encore grâce à des séquences d'insertion (Ochman, Lawrence et al. 2000).

2.2.1.1. Les transferts horizontaux

Le transfert horizontal de gènes a lieu lorsque du matériel génétique est transféré d'un organisme à un autre par une méthode autre que la reproduction (Heinemann and Bungard 2006). Le transfert horizontal préférentiel des gènes chez les procaryotes est fortement corrélé à la fonction des gènes. Plus précisément, les gènes participant à la transcription, à la traduction et aux processus connexes (gènes informationnels) sont beaucoup moins susceptibles d'être transférés horizontalement que les gènes de ménage (gènes opérationnels) (Rivera, Jain et al. 1998).

L'importance du transfert horizontal dans l'architecture et l'évolution constante des espèces bactériennes est évidente et pour que cela puisse avoir lieu, un certain nombre de conditions doivent être remplies. De nombreux obstacles empêchent le transfert, l'absorption et la stabilisation efficaces de l'ADN étranger (Thomas and Nielsen 2005). La réussite du transfert horizontal d'un gène dépend du type de transfert, de la relation entre la molécule transférée, ainsi que d'autres facteurs, tels que la distribution d'enzymes spécifiques intégrées associées à l'intégration de l'ADN (Van den Eede, Aarts et al. 2004). Les gènes acquis par transfert horizontal à partir de n'importe quelle espèce peuvent être délétères, neutres ou bénéfiques pour la souche receveuse (Bolotin, Quinquis et al. 2004).

Le transfert de plasmides permet aussi l'acquisition de gènes, comme le plasmide ColV qui confère divers avantages à la souche receveuse telles la production de toxines, la résistance au sérum et une adhérence accrue aux cellules cibles (Waters and Crosa 1991).

2.2.1.2. Les îlots de pathogénicité

Les îlots de pathogénicité sont un sous-ensemble d'îlots génomiques, qui sont de grands éléments génétiques acquis par transfert horizontal. Contrairement au génome principal, la séquence et la composition des îlots de pathogénicité peuvent varier considérablement d'une espèce bactérienne à l'autre et même au sein d'une même espèce. Une telle variabilité et plasticité permet aux bactéries de s'adapter à différents environnements (Schmidt and Hensel 2004).

Les îlots de pathogénicité peuvent posséder un à plusieurs gènes de virulence, et sont présents dans les génomes des bactéries pathogènes, mais absents des génomes des bactéries non pathogènes de la même espèce ou d'une espèce étroitement apparentée. Ce sont de grandes régions génomiques de 10 à 200 kb (Hacker and Kaper 2000). De plus, les îlots de pathogénicité ont souvent un pourcentage de bases guanine et cytosine (G + C) très différent de la teneur en G + C de l'ADN bactérien de l'hôte. Les raisons de cette variation ne sont pas connues, mais la conservation d'une composition de base spécifique à un genre ou à une espèce est une caractéristique remarquable des bactéries.

Les îlots de pathogénicité sont fréquemment situés à proximité des gènes d'ARNt. On suppose que l'insertion fréquente au niveau des locus d'ARNt peut être expliquée par le fait que les gènes codants pour les ARNt sont hautement conservés entre diverses espèces bactériennes. Après acquisition d'un gène par transfert horizontal, le fragment d'ADN contenant un gène d'ARNt peut être inséré dans le génome du destinataire par recombinaison entre les gènes d'ARNt. On

suppose également que certains bactériophages utilisent les gènes d'ARNt comme points d'insertion spécifiques dans le génome de l'hôte, ainsi les gènes d'ARNt serviraient de points d'ancrage spécifiques pour l'intégration d'ADN étranger (Schmidt and Hensel 2004).

Les îlots de pathogénicité sont également fréquemment associés à des éléments génétiques mobiles. Ils sont souvent accompagnés de répétitions directes, qui sont des séquences d'ADN de 16 à 20 pb (jusqu'à 130 pb) avec une répétition de séquence parfaite ou presque parfaite. Ces répétitions directes pourraient servir de site de reconnaissance pour l'intégration des bactériophages. De plus, ces répétitions directes agissent comme des séquences de reconnaissance pour les enzymes impliquées dans l'excision d'éléments génétiques mobiles, contribuant ainsi à l'instabilité des îlots de pathogénicité flanqués de ces séquences. Les îlots de pathogénicité portent souvent des gènes de mobilité cryptiques, voire fonctionnels, tels que des intégrases ou des transposases. Des éléments de séquence d'insertion (IS) sont fréquemment observés dans ces îlots de pathogénicité (PAI). Les PAI peuvent également posséder des plasmides intégrés, des transposons conjugatifs, des bactériophages ou des parties de ces éléments (Hacker, Blum-Oehler et al. 1997).

2.2.1.3. Les séquences d'insertion

Les séquences d'insertion (également appelé élément IS) sont des séquences d'ADN courtes qui agissent comme des éléments transposables simples. Les séquences d'insertion ont deux caractéristiques principales : elles sont petites par rapport aux autres éléments transposables (généralement d'une longueur d'environ 700 à 2500 pb) et ne codent que les informations génétiques liées à leur transposition et à leur régulation, contrairement aux transposons qui portent également des gènes impliqués dans d'autres fonctions (comme des résistances aux antibiotiques) (Schneider and Lenski 2004).

Plus de 1500 IS différentes ont été identifiées, qui sont classées dans une vingtaine de familles différentes sur la base de diverses fonctionnalités partagées comme le pourcentage d'identité de la séquence du gène de la transposase, de la conservation du site catalytique et l'organisation et la conservation des séquences répétées (Siguier, Filée et al. 2006). Les IS contribuent à l'évolution des îlots de pathogénicité, car, dans certains cas, elles sont à la base de la formation de PAI via d'insertions de plusieurs gènes séparément, où un exemple serait les gènes codant l'aérobactine retrouvé sur le plasmide ColV (de Lorenzo, Herrero et al. 1988, Mahillon, Léonard et al. 1999).

Les IS apporteraient à leur hôte des avantages sélectifs transitoires, tels que des transferts géniques latéraux et des réarrangements génomiques, mais pourraient être préjudiciables à leur hôte à long terme (Wagner 2005).

2.2.2. Facteurs de virulence UPEC

2.2.2.1. Les systèmes d'acquisition du fer

Les bactéries pathogènes ont toujours été en compétition pour le fer avec leurs hôtes, car celui-ci est un facteur essentiel pour de nombreux processus cellulaires procaryotes et eucaryotes (Andrews, Robinson et al. 2003). Chez les hôtes mammifères, les concentrations de fer libre sont basses : 10^{-25} M dans le sang, et souvent plus faibles à d'autres endroits (Fischbach, Lin et al. 2006). Pour leur croissance, les bactéries ont besoin d'une concentration en fer cytoplasmique d'environ 10^{-6} M. Pour acquérir ce fer qui est essentiel à leur survie, les bactéries pathogènes ont mis en place de multiples stratégies pour extraire le fer de l'hôte.

Dans le domaine *Bacteria*, on distingue au moins 4 grandes stratégies pour acquérir ce fer essentiel à la prolifération bactérienne. La première étant l'incorporation des protéines de l'hôte (la transferrine, la lactoferrine ou l'hémoglobine), via systèmes TonB-transporteurs. De plus de nombreuses bactéries pathogènes prélèvent directement l'hème du milieu extracellulaire.

Une deuxième stratégie grandement utilisée par les bactéries pathogènes est la réduction du fer ferrique ainsi que la réduction et le transport du fer ferreux. On retrouve chez *Escherichia coli* le système de transport du fer ferreux FeoA-FeoB (induit principalement en condition anaérobie) qui transporte et réduit le fer ferrique en fer ferreux (Kammler, Schön et al. 1993).

La troisième stratégie d'obtention du fer se fait grâce aux transporteurs de métaux de type ABC.

Enfin, la dernière stratégie utilise des sidérophores qui sont des molécules de faible poids moléculaire avec une forte affinité pour le fer ferrique. À ce jour, plus de 500 sidérophores ont été recensés et la plupart d'entre eux se classent parmi cinq groupes selon leurs structures chimiques et les groupements de liaison au fer. Il y a d'abord les sidérophores de type catécholates, dont le plus connu et étudié est l'entérobactine (entérochéline) (O'Brien and Gibson 1970). Les sidérophores de type phénolates s'apparentent aux catéchols, avec un hydroxyle en moins sur l'anneau du benzène. Les sidérophores de type hydroxamate constituent une autre catégorie dont fait partie une molécule bien connue, le ferrichrome. Les sidérophores de type carboxylates possèdent des structures avec des groupements carboxyles. Une dernière catégorie représente les sidérophores de structures mixtes : l'aérobactine qui est un dérivé de l'acide 6-(N-acetyl-N-

hydroxyamino)-2-aminohexanoïque et de l'acide citrique, qui réalise également une liaison hexadentate avec le fer ferrique (Figure 3).

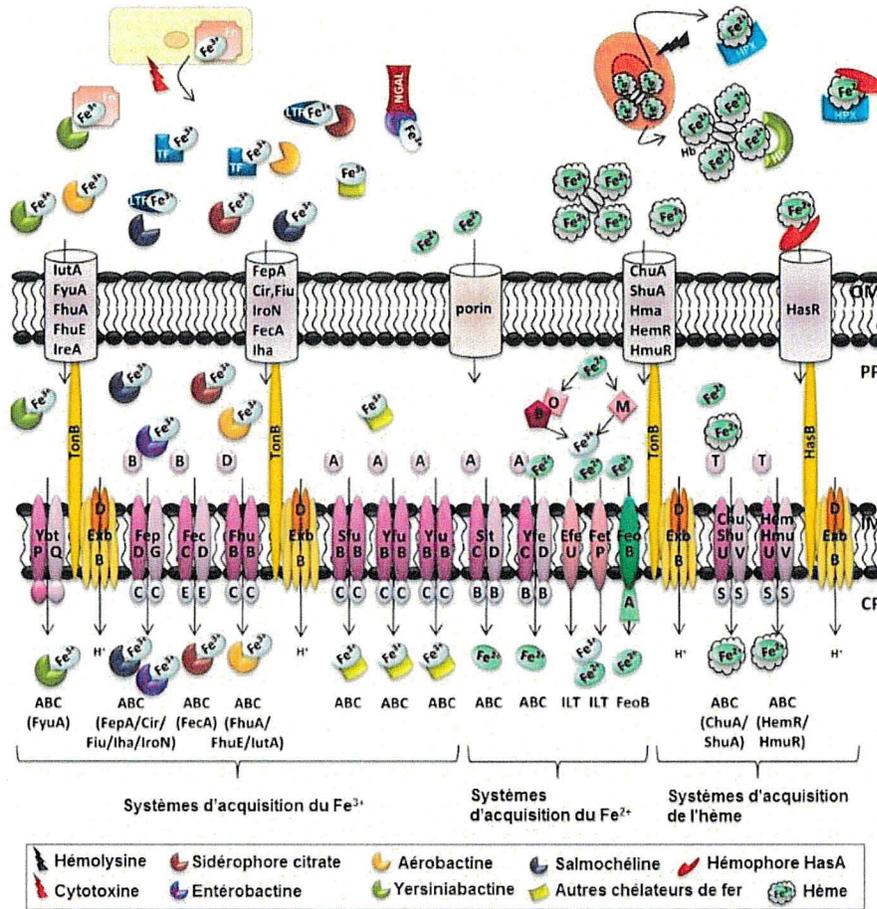


Figure 3 : Résumé des voies de base de transport et de libération du fer chez les bactéries à Gram négatif.

Les systèmes de transport fondamentaux pour les principales classes de sidérophores ferriques ainsi que pour le fer délivré par la transferrine et par l'hème sont présentés, en mettant l'accent sur le modèle de référence d'*E. coli* concernant la nomenclature des protéines Adapté de (Miethke 2013, Porcheron, Garénaux et al. 2013).

2.2.2.2. Les flagelles

La motilité est une propriété des bactéries qui est étroitement liée à la chimiotaxie, à la capacité de s'orienter le long de certains gradients chimiques. La combinaison de ces propriétés permet aux bactéries de détecter et de rechercher des éléments nutritifs, ainsi que de se rendre et de conserver leurs niches de prédilection pour la colonisation. Le mode de motilité le plus connu chez les bactéries est celui associé à l'utilisation d'une organelle rotative spécialisée, le flagelle (Macnab 2003).

Le flagelle est une structure supramoléculaire composée d'environ 20 composants protéiques et divisée en trois sous-structures : le filament, le crochet et le corps basal. Le filament est une hélice qui prend plusieurs formes distinctes dans diverses conditions. Les formes hélicoïdales des flagelles péritriches, polaires et latérales sont indépendantes les unes des autres et appartiennent à différentes familles de flagelles. Le corps basal contient le moteur rotatif, qui est généralement alimenté par une force proton motrice. L'anneau en C est une structure en forme de coupe attachée au côté cytoplasmique du corps basal et fonctionne comme le rotor du moteur et comme une partie de l'appareil de sécrétion. Environ 40 gènes nécessaires à l'assemblage flagellaire sont ordonnés de manière hiérarchique au niveau de la transcription (Chevance and Hughes 2008). L'assemblage flagellaire est également régulé au niveau de la porte de sécrétion, ce qui ne permet pas la sécrétion des protéines du filament tant que le corps de base du crochet n'est pas terminé. Le corps basal flagellaire partage des caractéristiques communes avec l'appareil de sécrétion des facteurs de virulence, ce qui indique que les deux systèmes dérivent d'un ancêtre commun.

Les flagelles sont fabriqués à partir de monomères protéiques appelés flagelline (FliC) (Honko and Mizel 2005). Dans les souches de l'UPEC, le flagelle est utilisé pour atteindre les nouveaux nutriments et pour échapper aux conditions défavorables et au système immunitaire de l'hôte (Lane, Alteri et al. 2007). Différentes études ont montré que l'expression de flagelles dans les souches UPEC coïncidait avec l'ascension de la bactérie dans les voies urinaires supérieures, ce qui montre le rôle important des flagelles dans le mouvement de la bactérie de la vessie vers les reins. De plus, le rôle important des flagelles a été démontré à différents stades de la formation de biofilms dans les voies urinaires (Pratt and Kolter 1998). Comme la plupart des souches UPEC sont mobiles, la fonction flagellaire semble être conservée au cours de l'évolution. De plus les flagelles jouent un rôle clé dans la dynamique des biofilms : il a récemment été signalé que pendant la formation du biofilm, les flagelles jouent différents rôles dans l'adhésion, la maturation et la dispersion, comme le montre l'expression et la régulation des gènes au cours de la phase de croissance (Nakamura, Yamamoto et al. 2016).

2.2.2.3. Les vésicules de membrane externe

Les vésicules de la membrane externe sont un produit naturellement sécrété par les bactéries à Gram négatif. Ce sont des particules sphéroïdes fermées de tailles hétérogènes (10 à 300 nm de diamètre) libérées par les bactéries pendant toutes les phases de croissance. Les vésicules se forment lorsqu'une partie de la membrane externe à contenu périplasmique est

sélectivement exportée (McBroom and Kuehn 2005). Un nombre croissant de pathogènes ont été documentés pour produire et sécréter des vésicules de membranes externes naturelles. De plus, la production de vésicules par des agents pathogènes peut se produire pendant l'infection.

Les produits extracellulaires des souches pathogènes sont souvent associés à une infection aiguë et sont essentiels à une virulence maximale. En tant qu'entités extracellulaires sécrétées, les vésicules de membrane externe peuvent modifier activement l'environnement bactérien. Les vésicules de membrane externe se sont révélées capables de délivrer des toxines actives et d'autres protéines bactériennes associées à la virulence aux cellules hôtes. Par exemple, les vésicules toxiques produites par les souches d'*E. coli* extra-intestinal (ExPEC) comportent une hémolysine de la famille des toxines RTX (Balsalobre, Silván et al. 2006). Plusieurs études sur différents agents pathogènes ont démontré que les toxines sont souvent localisées à la surface des vésicules. Les toxines associées à la surface des vésicules de membrane externe sont généralement très résistantes à la protéase, bien qu'elles se situent à la surface extérieure des vésicules.

2.2.2.4. Les Fimbriae (Pili)

Il existe chez les souches UPEC, deux groupes de fimbriae : les fimbriae sensibles au mannose et ceux résistants au mannose (Schembri, Kjaergaard et al. 2001). Les fimbriae de type 1 sont les fimbriae avec une adhésine sensible au mannose et sont les fimbriae les plus conservés parmi les souches d'*E. coli* et sont codés par l'opéron *fim*. Les fimbriae de type 1 sont codées par un groupe de gènes dans le chromosome bactérien. Ces fimbriae sont majoritairement composés d'un hétérodimère, appelé FimA, et d'autres petites composantes, notamment FimC, FimD, FimF, FimH et FimG (Thankavel, Madison et al. 1997). L'adhésine FimH localisée au bout du fimbriae est probablement le facteur principal dans la liaison de l'UPEC aux surfaces des cellules épithéliales de la vessie. La liaison des bactéries par l'adhésine FimH stimule l'entrée des bactéries dans les cellules épithéliales de la vessie et l'exfoliation ou l'apoptose des cellules épithéliales. Ces propriétés suggèrent le rôle des fimbriae de type 1 dans l'invasion cellulaire et la formation de structures résistantes telle que les biofilms (Dhakai, Kulesus et al. 2008).

Les fimbriae résistants au mannose sont très divers chez les souches UPEC, il en existe différents types en fonction des caractéristiques du récepteur et des autres propriétés. Les fimbriae P sont l'un des fimbriae les plus connus et sont codés par l'opéron *pap* présent sur certains îlots de pathogénicité. Ces fimbriae P sont composés d'une succession d'unités

répétitives de PapA. Au sommet de cette structure se trouve une adhésine appelée PapG, qui est équivalente à FimH dans les fimbriae de type 1, et qui avec trois autres sous-unités, appelée PapE, PapF et PapK forment la structure à l'extrémité des fimbriae P (Busch and Waksman 2012). Des études ont également montré que les fimbriae P jouent un rôle important dans la colonisation des reins par les souches UPEC (Roberts, Marklund et al. 1994).

2.2.2.5. Les adhésines non fimbriaires

Parmi les souches UPEC, il existe différentes adhésines non fimbriaires qui médient généralement l'adhésion sur des surfaces spécifiques, y compris les cellules et les protéines de la matrice extracellulaire. C'est le cas de TosA qui joue un rôle dans la colonisation des UPEC dans le tractus urinaire d'un modèle murin (Vigil, Stapleton et al. 2011). Certains membres de la famille des autotransporteurs, tels que FdeC (pour l'adhérence des facteurs *E. coli*), Antigen-43 (Ag43), UpaH, UpaC et UpaG, ont également été définis comme des adhésines non fimbriaires importantes parmi les souches UPEC (Wells, Totsika et al. 2010). Par exemple, en tant que facteur de surface, Ag43 joue différents rôles dans la pathogénicité des souches UPEC. Elle sert en effet à la liaison, la colonisation, la formation de biofilm et la survie des bactéries dans la vessie (Ulett, Valle et al. 2007). L'autotransporteur trimérique UpaG est également impliqué dans la liaison des bactéries aux cellules épithéliales de la vessie et aux protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, ainsi qu'à l'agrégation cellulaire et à la formation de biofilms (Valle, Mabbett et al. 2008). On retrouve également parmi les autres adhésines non fimbriales, l'adhésine Iha qui est une protéine membranaire se retrouvant chez environ 55% des souches UPEC et qui permet, à une bactérie non adhérente, d'adhérer aux cellules de vessie et de reins. Elle sert aussi de récepteur pour l'entérobactine, permettant à la bactérie de récupérer le fer capté par les sidérophores (Léveillé, Caza et al. 2006).

2.2.2.6. Les toxines

En général, les souches UPEC n'ont pas le système de sécrétion de type III utilisé par certains autres agents pathogènes pour injecter des molécules effectrices dans les cellules hôtes, cependant certaines de ces souches utilisent des systèmes de sécrétion de type I et V pour sécréter des toxines (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004). Ces toxines comprennent l' α -hémolysine (HlyA), le facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF1) et des toxines autotransporteurs telles que la cytotoxine autotransporteur vacuolante (Vat) et la toxine autotransporteur sécrétée

(Sat) (Wiles, Kulesus et al. 2008). Ces toxines provoquent des défauts dans la fonction ou la forme des cellules hôtes, arrêtent le cycle cellulaire ou lysent les cellules (Figure 4).

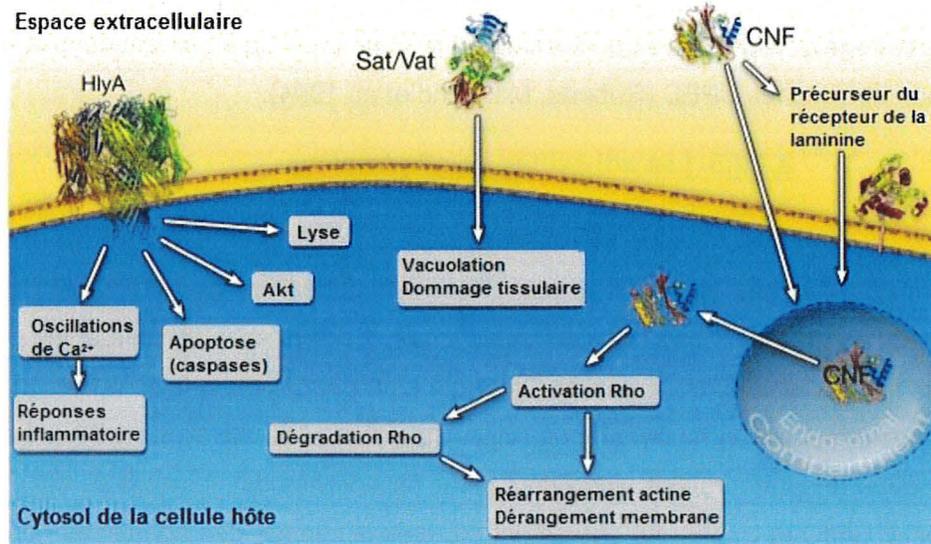


Figure 4 : Toxines associées aux souches UPEC. L'a-hémolysine (HlyA), Vat, Sat et le facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF) sont codés par de nombreux isolats de souches UPEC, adapté de (Wiles, Kulesus et al. 2008).

Gauche : À des concentrations élevées, HlyA s'insère dans la membrane des cellules hôtes cibles et favorise leur lyse, tandis qu'à des concentrations sublytiques, HlyA peut moduler les cascades de signalisation affectant la survie des cellules hôtes et leurs réponses inflammatoires. *Milieu* : L'intoxication des cellules hôtes par Vat ou Sat induit une vacuolisation et d'autres effets cytopathiques, entraînant des lésions du tissu hôte. *Droite* : L'endocytose des CNF se produit par l'intermédiaire du précurseur du récepteur de la laminine ou par le biais de mécanismes de délivrance alternatifs associés aux vésicules de la membrane externe. Les conditions dans le compartiment endosomal stimulent la translocation du domaine catalytique du CNF dans le cytosol de l'hôte, où il active les Rho GTPases, induisant leur dégradation éventuelle et un frocement de la membrane.

HlyA :

HlyA est une toxine calcium-dépendante de 110 kDa qui forme des pores de 2 nm de diamètre dans les cellules hôtes, et quand de fortes concentrations d'HlyA sont présentes cela conduit à une lyse cellulaire (Ostolaza 1995). Sur gélose au sang complétement en Ca^{2+} , HlyA produit de larges zones claires d'hémolyse autour des colonies. Dans la littérature l'hémolysine est le membre le mieux caractérisé de la famille des toxines RTX (Welch, Forestier et al. 1992). L' α -hémolysine (HlyA), est codée par l'opéron *hlyCABD* et est présente chez environ 50% des isolats des souches UPEC et son expression est associée à une sévérité clinique accrue chez les patients présentant une infection urinaire (Johnson 1991, Marrs, Zhang et al. 2005). La souche UPEC 536 est connue pour posséder 2 copies de cet opéron (Wiles, Kulesus et al. 2008).

Les environnements des hôtes infectés par les souches ExPEC sont extrêmement pauvres en nutriments et la fonction de HlyA dans l'infection consiste principalement à détruire les cellules hôtes, ce qui aura pour conséquence la libération de nutriments et d'autres facteurs, tels que le

fer, qui est essentiel à la croissance bactérienne (Ratner, Hippe et al. 2006). HlyA a un large spectre d'activité cytotoxique, attaquant les érythrocytes, les granulocytes, les monocytes, les cellules endothéliales et les cellules épithéliales rénales de souris, ruminants et primates (Stanley, Koronakis et al. 1998). HlyA modifie la perméabilité membranaire des cellules hôtes, provoquant ainsi la lyse et la mort des cellules hôtes. La lyse des érythrocytes fournit du fer aux bactéries et tuer les cellules nucléées empêche la phagocytose. La libération de cytokines a pour conséquence d'induire une inflammation, de perturber les jonctions épithéliales de cellules et de favoriser la translocation de la bactérie à travers la barrière intestinale (Bien, Sokolova et al. 2012). Le domaine répété riche en glycine associé à la liaison à HlyA Ca^{2+} est nécessaire pour l'hémolyse des érythrocytes, mais pas pour la formation de pores, car sa délétion ne modifie pas l'activité de formation de pores de HlyA. La toxine permet aussi une exfoliation des cellules de l'urothélium, endommage les cellules rénales afin de faciliter la translocation au système sanguin menant à une septicémie et, finalement, la lyse de macrophages réduit le niveau de phagocytose (Johnson 1991).

L' α -hémolysine est en général associée à des lésions rénales et à des cicatrices, ceci engendre des variations de concentrations de Ca^{2+} dans les cellules épithéliales des tubes rénaux, ce qui a pour conséquence la poursuite de la colonisation des uretères et du parenchyme rénal en perturbant l'écoulement normal de l'urine. Récemment, il a été découvert que l' α -hémolysine induisait la mort cellulaire dépendante de Caspase-1 / Caspase-4 pro-inflammatoire dans les cellules épithéliales de la vessie, entraînant une exfoliation cellulaire (Nagamatsu, Hannan et al. 2015).

Un autre gène codé par le plasmide CoIV, *hlyF* est un autre facteur de virulence chez les souches APEC et NMEC. HlyF est connue pour être impliquée dans la surproduction de vésicules de la membrane externe (OMV). L'induction des OMV par HlyF contribue ensuite à la libération de facteurs de virulence bactérienne, comme la toxine la cytolysine A (ClyA), et favorise la pathogénèse chez les hôtes infectés (Murase, Martin et al. 2015).

Facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF 1) :

Le facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF 1) est présent chez certaines souches UPEC, au niveau d'une PAI, et se trouve généralement à la suite de l'opéron *hlyCABD*. CNF1 est transcrit sur un seul ARN messager avec les gènes de l'hémolysine (Lemonnier, Landraud et al. 2007). Le CNF1 modifie le cytosquelette d'actine des cellules hôtes et favorise l'invasion bactérienne des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique. Le CNF 1 est une toxine codée par le

chromosome bactérien qui affecte diverses fonctions cellulaires *in vitro* par l'activation de Rho GTPases qui sont des régulateurs clés du cytosquelette d'actine (Fiorentini, Fabbri et al. 1997).

En effet CNF 1 est produit dans le milieu extracellulaire, quand il se lie aux récepteurs de surface cellulaire, il est internalisé par endocytose. La liaison de la toxine au récepteur de surface cellulaire permet au CNF1 d'entrer dans les vésicules endocytaires. La toxine utilise alors les conditions acides des endosomes pour injecter son domaine catalytique à l'intérieur du cytosol de la cellule hôte (Lemichez, Flatau et al. 1997, Fabbri, Travaglione et al. 2010). Une fois dans le cytoplasme de la cellule cible, CNF 1 cause l'activation des Rho GTPases par une modification post-traductionnelle, perturbant ainsi les fonctions cellulaires telles que la régulation de l'organisation et de la dynamique du cytosquelette d'actine. Cette perturbation des fonctions cellulaires mène à l'apoptose des cellules cibles et diminue la phagocytose ainsi que le relâchement d'espèces réactives de l'oxygène, minimisant ainsi la réponse inflammatoire de l'hôte (Lemonnier, Landraud et al. 2007).

Les toxines autotransporteurs :

Les souches UPEC produisent également des toxines autotransporteurs qui contribuent à la pathogénèse des infections urinaires. Les autotransporteurs sont une famille de protéines capables de s'autosécréter à travers la membrane d'une bactérie à Gram négatif grâce à un mécanisme appelé sécrétion de type V (Restieri, Garriss et al. 2007).

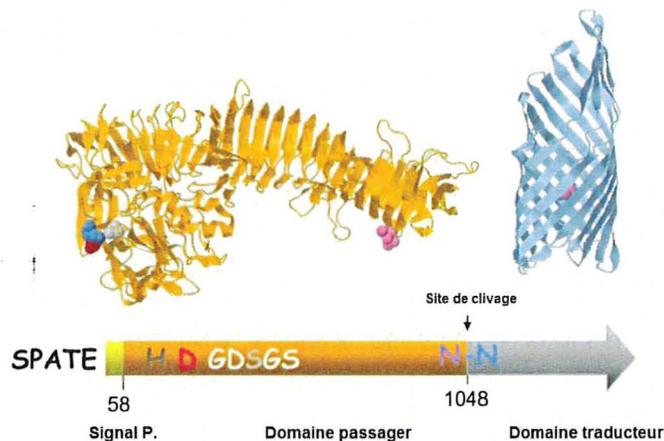


Figure 5 : Structure générale des « Serine Protease Autotransporter of Enterobacteriaceae » (SPATE) (Ruiz-Perez and Nataro 2014).

La toxine autotransporteur sécrétée Sat et la cytotoxine autotransporteur vacuolante Vat font partie de ces protéines. Sat et Vat appartiennent au sous-groupe des autotransporteurs SPATEs (« serine protease autotransporter of *Enterobacteriaceae* ») (Figure 5). Les SPATEs

matures possèdent de façon hautement conservée, un domaine aminé terminal permettant le transport du précurseur vers la membrane interne dépendant de la protéine Sec, un domaine α (ou domaine passager) donnant sa fonction à la protéine, et un domaine carboxylé terminal permettant la sécrétion à travers la membrane externe grâce à un tonneau β . Les SPATEs sont divisés en 2 classes phylogénétiquement en fonction des structures et des activités des toxines : classe I et II (Dutta, Cappello et al. 2002).

La classe I comprend la toxine Pet (« Plasmid encoded toxin ») produit par les EAEC, la sérine protéase plasmidique extracellulaire EspP produite par les EHEC, l'EspC produit par les EPEC, le SigA de *Shigella flexneri*, de Afa/Dr produit par les DAEC et enfin Sat fait également partie des SPATEs de classe I. Vat quant à lui fait partie des SPATEs de classe II (Liévin-Le Moal, Comenge et al. 2011).

Le gène *sat* codant pour l'autotransporteur Sat prédomine dans les souches UPEC, notamment présent sur l'îlot de pathogénicité II (PAI-II_{CFT073}) chez la souche CFT073, et il est également retrouvés chez d'autres *E. coli* pathogènes, dont les EAEC et certains isolats de *Shigella* (Guyer, Radulovic et al. 2002, Roy, Thanasekaran et al. 2006). Sat est connu pour avoir certains effets biochimiques *in vitro*, tels que la dégradation de la caséine, de la spectrine ou encore de la fodrine (Maroncle, Sivick et al. 2006). Elle possède également une activité cytopathique, provoque des lésions histologiques au niveau des cellules des reins et de la vessie (Guyer, Henderson et al. 2000), et peut aussi modifier la distribution des jonctions étroite et modifier la perméabilité cellulaire des cellules épithéliales intestinales (Guyer, Radulovic et al. 2002).

La protéine Vat se trouve également présente sur un îlot de pathogénicité chez diverses souches ExPEC dont les APEC, UPEC et les EIEC (Heimer, Rasko et al. 2004). Vat possède une homologie de 69,6-79 % avec l'autotransporteur Tsh. Vat semble causer un délai dans l'infiltration des neutrophiles lors d'une infection en clivant les glycoprotéines de surface des leucocytes impliqués dans le recrutement et migration des neutrophiles (Ruiz-Perez, Wahid et al. 2011). Cette toxine est importante dans les infections aviaires, principalement les infections respiratoires et cellulites, et son rôle lors des infections du tractus urinaire reste à être démontré, malgré le fait qu'il y a expression lors des infections du tractus urinaire (Wiles, Kulesus et al. 2008). Vat semble surtout présent chez les souches pathogènes causant une septicémie et serait important pour l'entrée ou la survie dans le sang (Henderson, Navarro-Garcia et al. 2004).

D'autres toxines autotransporteurs ont été récemment découverte chez des souches APEC et UPEC : TagB et TagC et Sha. Ces nouveaux autotransporteurs confèrent la capacité aux bactéries les possédant d'infecter plusieurs hôtes. Ces autotransporteurs jouent un rôle dans l'infection et la virulence des voies urinaires chez le modèle murin. Ils contribuent aussi de manière significative pour l'auto-agrégation, pour l'hémagglutination, pour l'adhésion des bactéries aux cellules épithéliales des hôtes et ont également été caractérisés comme ayant des effets cytopathiques. Le mécanisme d'action ainsi que les cibles spécifiques de ces autotransporteurs n'ont cependant pas encore été déterminés (Habouria, Pokharel et al. 2019).

2.2.3. Facteurs de virulence des APEC

Lors d'une infection par des APEC, plusieurs facteurs de virulence sont impliqués, principalement en raison d'une corrélation positive entre les caractéristiques phénotypiques et la virulence chez le poulet. Ces derniers sont le plasmide ColV, les fimbriae de type 1, type P et curli, l'aérobactine, les salmochélines, l'antigène capsulaire K, l'hémagglutinine thermosensible Tsh, l'autotransporteur Vat, la résistance aux phagocytes et la résistance au sérum (Dozois, Daigle et al. 2003).

2.2.3.1. Le plasmide de virulence : ColV

Plusieurs études ont montré la relation entre la virulence des APEC et la présence d'un plasmide ColV. Ces plasmides de grande taille codent plusieurs facteurs de virulence tels que l'aérobactine, Tsh, ainsi que des gènes conférant une résistance au sérum (*iss* et *traT*), le système de transport du manganèse et le transporteur de métaux SitABCD (Dozois, Dho-Moulin et al. 2000). Ce plasmide code aussi pour la colicine V, une bactériocine produite par *E. coli* qui cible et tue d'autres souches d'*E. coli*. Certains plasmides ColV codent pour d'autres facteurs de virulence comme la salmochéline, l'hémolysine putative aviaire HlyF, la protéase de membrane externe OmpT, ou le système de transporteur ABC Ets et le système de transport Eit (Johnson and Nolan 2009). Les plasmides ColV sont également connus pour conférer une résistance au chlore et aux désinfectants, pour la croissance dans l'urine humaine, la croissance accrue en conditions de pH acide et à la résistance des bactériophages (Johnson and Nolan 2009). Outre le plasmide ColV, d'autres plasmides codants pour la colicine ont déjà été identifiés parmi les souches ExPEC.

2.2.3.2. Fimbriae

Les fimbriae de type 1 sont des facteurs de virulence importants dans la fonction d'adhésion des souches pathogènes d'*E. coli* à l'épithélium des voies respiratoires des poulets. Les fimbriae de type 1 sont codés par les gènes *fim*, et sont constitués d'une protéine majeure FimA associée à des protéines auxiliaires, FimF, FimG et l'adhésine FimH (Hamrick, Harris et al. 2000). Les fimbriae de type 1 sont principalement importants pour l'infection et la colonisation de la trachée, des poumons et des sacs aériens, et leur expression n'a par contre jamais été observée dans d'autres organes ni le sang (Pourbakhsh, Dho-Moulin et al. 1997). Cependant le rôle des fimbriae de type 1 lors des infections n'est pas encore clair. Il a été démontré que les fimbriae de type 1 pourraient être considérés grâce à FimH, comme des activateurs de phagocytose de bactéries et de recrutement de neutrophiles au site d'infection (Wooley, Spears et al. 1992). Il a été suggéré que, bien que les fimbriae de type 1 soient nécessaires à la colonisation initiale de l'épithélium respiratoire, des facteurs supplémentaires tels que la motilité et la production de colicine V seraient responsables de la persistance de la colonisation. De plus, les fimbriae de type 1 ne sont pas strictement nécessaires en tant que facteur de colonisation lors du développement de la colibacillose aviaire (Marc, Arné et al. 1998).

Les fimbriae P sont codés par le groupe de gènes *pap*. Ces fimbriae sont composés principalement d'une importante sous-unité fimbriale, PapA, et d'une adhésine PapG située en extrémité terminale, qui présente au moins 3 variants moléculaires : classes I, II et III reconnaissant différents isorécepteurs contenant un D-galactosyl-(1-4)- β -galactopyranosil carbohydrate (Hacker 1992). Les gènes *papI* et *papB* sont des régulateurs responsables du processus de variation de phase. Le gène *papE* code pour l'extrémité structurale fimbriale, et les gènes *papD*, *papH*, *papJ*, *papF* et *papK* sont responsables de l'expression de protéines liées à l'intégrité de la biogenèse du complexe fimbriaire (Mol and Oudega 1996). Ces fimbriae sont considérés comme des hémagglutinines de type mannose résistantes (MRHA) et sont synthétisés dans les poumons, les reins, le sang et le fluide péricardique durant l'infection, et sont donc associés à la septicémie (Dozois, Fairbrother et al. 1992).

2.2.3.3. Capsule

La capsule, codé par les gènes *kps* et absente chez les souches d'*E. coli* non pathogènes K-12, est composé d'acide N-acétyl muramique à la surface des cellules qui protège la bactérie contre la réponse immunitaire non spécifique de l'hôte tout en étant faiblement immunogène. Ceci en raison de sa similitude avec les fragments d'acide polysialique sur les glycoprotéines de surface cellulaire, ce qui semble indiquer qu'il est impliqué dans les défenses immunologiques

(Dho-Moulin and Fairbrother 1999). L'antigène capsulaire K1 quant à lui est plus fréquemment associé aux souches APEC les plus pathogènes telles que les sérogroupes O1 et O2, et est associé à la résistance au sérum et à la virulence (Gyles 1994). Par contre, des souches de certains sérogroupes comme O78 manquent de capsule mais sont sérums résistants (Mellata, Dho-Moulin et al. 2003).

2.2.3.4. Hémagglutinine thermosensible Tsh

L'hémagglutinine thermosensible est codée par le gène *tsh*, et c'est un autotransporteur découvert chez la souche APEC χ 7122, qui est présent non seulement chez les APEC, mais aussi chez certaines autres souches d'*E. coli* pathogènes (Parreira and Gyles 2003). Tsh est une protéase à sérine SPATE qui contribue à la médiation de l'adhésion bactérienne pendant le début des infections (Stathopoulos, Provence et al. 1999). La régulation de la transcription de Tsh dépend de la température. Le gène *tsh* est situé dans des plasmides de poids moléculaire élevé, retrouvé fréquemment chez les APEC sur des plasmides CoIV (Dozois, Dho-Moulin et al. 2000). De par sa présence fréquente chez des souches APEC pathogènes, le gène *tsh* est parfois utilisé en tant que marqueur moléculaire pour la détection des APEC pathogènes (Ewers, Janßen et al. 2004). Il est intéressant de noter que Tsh est presque identique à Hbp, pouvant dégrader l'hémoglobine humaine, lier l'hème et est important pour la formation d'abcès chez la souris (Otto, Van Dooren et al. 2002). Généralement, les hémagglutinines sont exprimées à 37°C, mais chez la souche sauvage χ 7122, la synthèse de Tsh est augmentée à 42°C, comparé au niveau d'expression à 26°C, mais l'activité d'héماغglutination est optimale à 26°C (Dozois, Dho-Moulin et al. 2000). Tsh a la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales, à l'hémoglobine, aux fibronectines et au collagène IV. Cet autotransporteur possède également une activité protéolytique contre la caséine (Kobayashi, Gaziri et al. 2010). Tsh contribue au développement de lésions et au dépôt de fibrine dans les sacs aériens chez la volaille. Il est aussi capable d'agglutiner les érythrocytes de poulet et d'autres espèces (Habouria, Pokharel et al. 2019).

2.2.3.5. Résistance à l'effet bactéricide du sérum

La résistance aux effets bactéricides du sérum des souches APEC (particulièrement des cas de septicémies aviaires), médiée par les structures de surface bactériennes telles que la capsule, le lipopolysaccharide, la production de CoIV et les protéines de la membrane externe. Différents facteurs entrent en compte pour la résistance à l'effet bactéricide du sérum. Le facteur

Iss (Increased serum survival) est connu pour être associé à la pathogénicité des APEC car il est fréquemment retrouvé parmi les APEC pathogènes (Horne, Pfaff-McDonough et al. 2000). Le polysaccharide O78 et la capsule K1 sont également des facteurs de virulence connus qui augmentent la survie à l'effet bactéricide du sérum. En effet, les fimbriae P, l'antigène O78 et la capsule K1 réduisent le taux de phagocytose, mais une fois que la cellule bactérienne est phagocytée, les fimbriae de type 1, de type P et l'antigène O78 protègent la bactérie de l'effet bactéricide des macrophages. Ces facteurs de virulence permettent la survie des bactéries à l'intérieur des macrophages en causant une régulation négative des fonctions antimicrobiennes des macrophages, mais le mécanisme exact n'est pas encore bien défini (Mellata, Dho-Moulin et al. 2003).

2.3. Toxines RTX et leurs effets cytotoxiques

Les facteurs de virulence des APEC qui nous intéressent dans cette étude sont les toxines RTX. Les RTX (repeats in toxin) sont des toxines faisant partie des membres d'une famille de protéines synthétisées par une gamme de bactéries pathogènes à Gram négatives. Celles-ci possèdent deux caractéristiques communes, la présence de répétitions riches en glycine et aspartate et la sécrétion via un système de sécrétion de type 1 (SST1) (transporteur « ATP-Binding Cassette » (ABC)) (Welch 2001). Les membres de la famille des toxines RTX, comprennent les toxines cytolytiques, les métalloprotéases et les lipases. Ces toxines sont connues pour posséder une organisation génique commune et des caractéristiques structurales distinctes.

Bien que des variations existent, l'opéron générique de la toxine RTX consiste en quatre gènes qui sont désignés par *rtxC*, *A*, *B* et *D* dans l'ordre de la transcription. *RtxA* code pour la synthèse du précurseur de la toxine, *RtxC* est une acétyl-transférase, et *RtxB* et *D* sont en charge du système d'export via le transporteur de type ABC de la toxine dans le milieu extracellulaire (Stanley, Packman et al. 1994). Les *RtxB* sont des membres de la superfamille des cassettes de liaison à l'ATP des protéines de transport, et les *RtxD*, uniques aux procaryotes, appartenant à la famille des protéines de fusion membranaire. Les toxines RTX nécessitent une modification post-traductionnelle pour devenir biologiquement actives. Cette étape d'activation est accomplie par acylation d'acide gras du produit du gène structural *rtxA* et nécessite la participation du produit du gène *rtxC* et d'une protéine porteuse d'acyle. La toxine produite en l'absence de *rtxC* est biologiquement inactive. Le composant de membrane externe, *TolC*, est une protéine multifonctionnelle, qui est codé en dehors de l'opéron *hly* sur les chromosomes des souches et

qui est nécessaire à l'export de la toxine dans le milieu extracellulaire, car TolC forme un canal d'exportation trimérique dans la membrane externe (Figure 6). Les toxines RTX sont des toxines protéiques formant des pores, qui possèdent une masse moléculaire de 100 à 200 kDa. *In vitro*, les toxines RTX présentent généralement une activité cytotoxique et souvent aussi hémolytique. Elles sont aussi connues pour causer des maladies infectieuses chez les animaux et les hommes, et surtout dans les espèces de la famille des *Pasteurellaceae* (Lally, Hill et al. 1999).

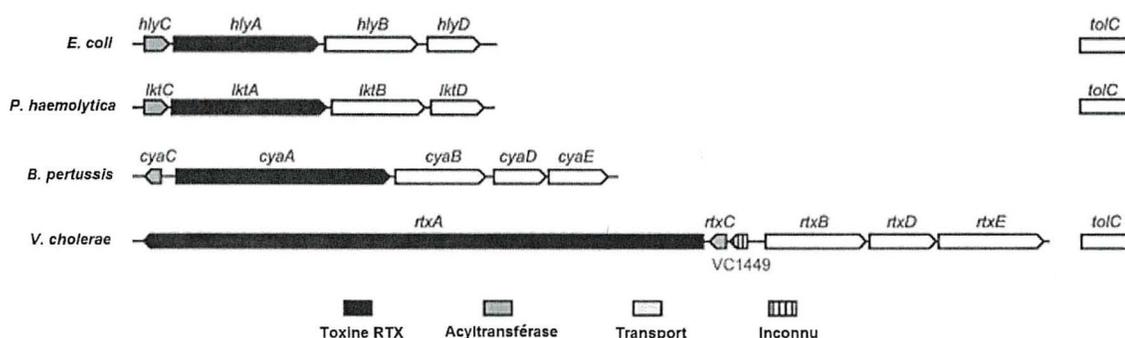


Figure 6 : Représentation schématique de l'arrangement génétique des locus *rtx* d'*Escherichia coli*, de *Pasteurella haemolytica*, de *Bordetella pertussis* et de *Vibrio cholerae*. Structures de domaine des cytotoxines RTX HlyA (*E. coli*), LktA (*P. haemolytica*), CyaA (*B. pertussis*) et MARTXVc (*V. cholerae*) avec indication des sites de modification post-traductionnelle des lysines internes par fixation covalente de résidus d'acyle. Adapté de (Linhartová, Bumba et al. 2010).

Les protéines RTX contiennent un signal de sécrétion C-terminal long d'environ 60 résidus qui est reconnu par le SST1, qui intervient dans la translocation de protéines directement du compartiment cytoplasmique dans l'espace extracellulaire à travers un canal couvrant toute l'enveloppe de la cellule (Šebo and Ladant 1993). Le système de sécrétion de type 1 dans la paroi cellulaire dépend de trois protéines spécifiques : une protéine membranaire interne polytopique qui possède un domaine cytoplasmique ATPase qui sert de transporteur ABC, une protéine de fusion membranaire (MFP) et une protéine membranaire externe (OMP). La protéine de fusion membranaire se situe dans la membrane interne périplasmique et s'étend jusqu'au système de transporteur ABC et également la protéine de membrane externe (Figure 7). Ce système est décrit plus précisément partie 2.4.

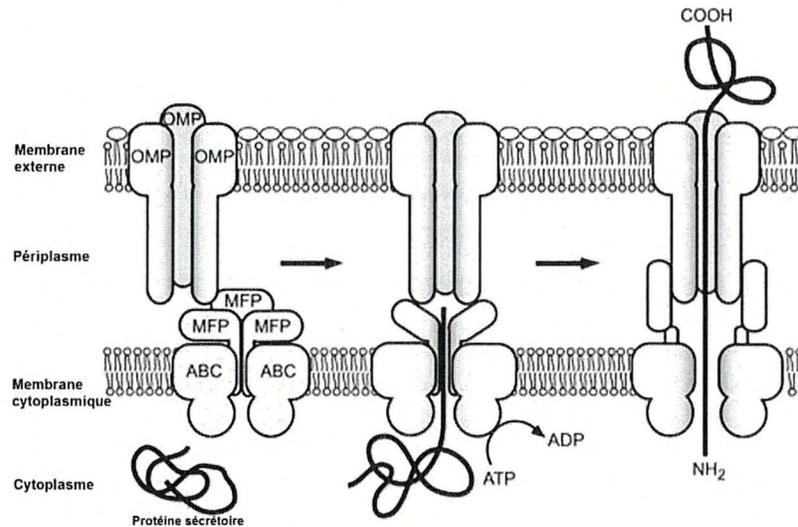


Figure 7 : Schéma de l'organisation de l'export de protéines d'un système de sécrétion de type 1 (SST1). Adapté de (Linhartová, Bumba et al. 2010).

Légende : OMP : « outer membrane protein » ; MFP : « membrane fusion protein » ; ABC : transporteur de type ABC.

La structure répétée des toxines RTX, qui leur a donné leur nom, est composée de nonapeptides itératifs riches en glycine liant le Ca²⁺ sur la moitié C-terminale de la protéine (Figure 8). L'analyse génétique des toxines RTX de différentes espèces de *Pasteurellaceae* et de quelques autres bactéries à Gram négatif a mis en évidence le transfert horizontal de gènes codant pour les toxines RTX et a conduit à des spéculations selon lesquelles les toxines RTX pourraient provenir de *Pasteurellaceae*.

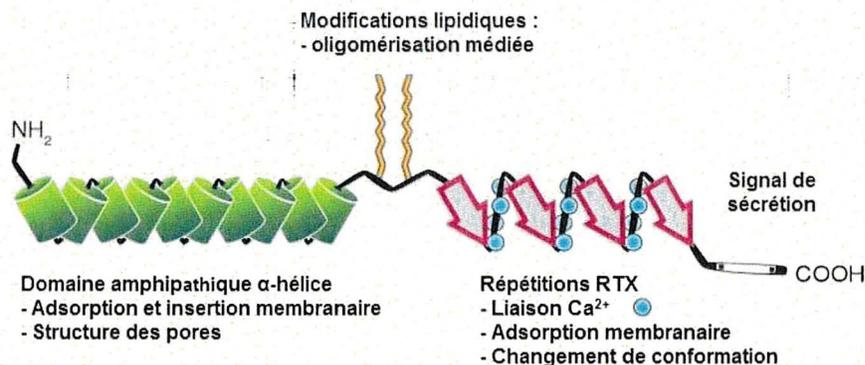


Figure 8 : Résumé de l'organisation des toxines de la famille des RTX et leurs fonctions. Adapté de (Wiles and Mulvey 2013).

Ce groupe de toxines n'inclut pas seulement les toxines avec une activité cytotoxique. Certaines toxines RTX exhibent plutôt une activité protéolytique ou lipolytique. Ces protéases ou lipases sécrétées par la bactérie agissent en synergie avec divers autres facteurs de virulence utilisés par la bactérie. Il existe aussi les MARTX (« multifunctional autoprocessing RTX toxins »), un groupe de toxines dont la taille est supérieure à 3200 acides aminés, ou 200 kDa, et qui possèdent plusieurs activités (Linhartová, Bumba et al. 2010). Les hémolysines RTX sont toxiques pour un large éventail de types de cellules appartenant à de nombreuses espèces, notamment les érythrocytes, les fibroblastes d'embryon de poulet, les granulocytes d'embryon de lapin et les fibroblastes de souris (Lally, Hill et al. 1999). Cependant, les autres protéines de l'autre catégorie de protéines RTX ne sont toxiques que pour des groupes restreints de cellules et sont également spécifiques à une espèce. Bien que le mécanisme de la cytotoxicité des toxines RTX soit conservé, des différences dans la spécificité de la cellule hôte indiquent que certaines régions de toxines RTX possèdent une spécificité particulière.

Le Tableau I présente la liste des toxines RTX utilisées lors de cette étude avec leurs principales caractéristiques génétiques et fonctionnelles. Bien que de nombreuses toxines RTX possèdent des activités cytotoxiques et hémolytiques vis-à-vis d'un large éventail de cellules et d'érythrocytes, quelques toxines RTX se sont révélées avoir une activité cytotoxique uniquement contre des cellules d'hôtes spécifiques et/ou montrer une spécificité de type cellulaire. Il existe d'autres preuves montrant que les toxines RTX jouent un rôle potentiel dans la spécificité de l'hôte de certains agents pathogènes.

Tableau I : Différents membres de la famille des RTX (Welch 2001, Bielaszewska, Aldick et al. 2014, Bárcena-Uribarri, Benz et al. 2015).

Toxines RTX	Bactéries	Taille de <i>rtxA</i> (kDa)	Classe de toxines RTX	Spécificité d'hôte	Spécificité du type de cellule
HlyA	<i>E. coli</i> uropathogène	110	Hémolysine	Humain, murin, bovin et autres	Erythrocytes, leucocytes, épithélial, et autres
EhxA	<i>E. coli</i> entérohémorragique	107	Hémolysine	Bovin	Mixtes, érythrocytes, leucocytes

TosA	<i>E. coli</i> uropathogène		Hémolysine	Murin et humain potentiellement	Epithéliales
ApxIA	<i>Actinobacillus pneumoniae</i>	105	Hémolysine	Spectre large comme HlyA	Spectre large comme HlyA
ApxIIA	<i>Actinobacillus pneumoniae</i>	103	Hémolysine	Porcin	Leukocytes
ApxIIIA	<i>Actinobacillus pneumoniae</i>	120	Hémolysine	Porcin	Leukocytes
LktA	<i>Pasteurella haemolytica</i>	105	Leucotoxine	Bovin	Leukocytes et plaquettes
LtxA	<i>Actinobacillus actinomycetemcomitans</i>	114	Leucotoxine	Humain	Leukocytes
CyaA	<i>Bordetella pertussis</i>	200	Leucotoxine	Spectre large	Spectre large
MARTX_{Vc}	<i>Vibrio cholerae</i>	484	MARTX	Humain	Fibroblastes rénales, épithéliale du larynx
MARTX_{Vv}	<i>Vibrio vulnificans</i>	550	MARTX	Primate et humain	Epithéliales intestinales

Comme dit précédemment, les répétitions de glycine et d'aspartate présentent sur les toxines RTX sont l'endroit où la liaison au Ca^{2+} se fait, mais il est également connu que l'hémolyse ou la cytotoxicité des toxines RTX dépend de cette liaison avec le Ca^{2+} . Le rôle précis de la structure de répétition du Ca^{2+} dans le fonctionnement des toxines RTX reste cependant inconnu pour le moment. Cependant, la suppression d'un petit nombre de répétitions est tolérable ou peut être compensée par une augmentation des niveaux d'ions Ca^{2+} dans l'environnement, mais la stabilité des toxines dépend de ces répétitions. Les structures secondaire et tertiaire des domaines de répétition des toxines RTX ne sont pas encore totalement connues non plus, mais il est supposé par analogie avec la protéase alcaline de RTX de *Pseudomonas aeruginosa* que les répétitions seraient susceptibles de former une structure rouleau β parallèle et allongée avec les brins β enroulés dans une spirale avec des ions Ca^{2+} (Zhang, Conway et al. 2012).

Le large spectre d'hôtes et les nombreux types de cellules lysées par les toxines de la famille des RTX ont conduit à l'hypothèse que la mort cellulaire était induite par leur insertion à l'intérieur de la membrane de l'hôte pour former des pores, entraînant un choc osmotique, un gonflement cellulaire et enfin une lyse cellulaire. Les toxines RTX peuvent être produites sous forme de monomère en solution et ces monomères ont tendance à s'agréger. En effet, même si

ces monomères ont la capacité de se lier de manière réversible à la membrane en absence de fixation de Ca^{2+} au niveau des répétitions des toxines RTX, la fixation du Ca^{2+} est une condition nécessaire pour induire le changement conformationnel et la perméabilisation de la membrane (Cortajarena, Goñi et al. 2002). Il existe donc trois mécanismes de formation de pores chez les toxines de la famille des RTX, soit la formation de pore de manière récepteur-indépendant, la formation de pore de façon récepteur-dépendant ou encore la formation de pore par l'association des toxines avec des vésicules de la membrane externe.

L'apoptose et la nécrose sont deux formes de mort cellulaire présentant des caractéristiques morphologiques et biochimiques distinctes. Des études réalisées ont permis de démontrer que ces deux types d'activités sont détectées dans des cultures tissulaires exposées à une toxine RTX (Mangan, Taichman et al. 1991, Korostoff, Wang et al. 1998). En contact avec de fortes concentrations en toxine, les cellules cibles meurent très rapidement, ce qui est plutôt caractéristique de la nécrose. En revanche, en contact avec de faibles concentrations en toxines, les cellules cibles semblent subir des modifications morphologiques, biochimiques et moléculaires, ce qui est plutôt associé à l'apoptose. Selon (Kroemer, Dallaporta et al. 1998), la détermination de la mort cellulaire est corrélée avec les perturbations de la fonction mitochondriale, qui jouent donc un rôle clé. Ainsi pour les toxines de la famille des RTX, la concentration de toxines entrant en contact avec les cellules hôtes semble déterminer l'étendue du dysfonctionnement mitochondrial et des événements connexes.

Il existe deux phases lors de la cytotoxicité médiée par RTX : une phase d'adsorption passive sur la surface de la cellule cible et une phase d'insertion dans la membrane. Les forces électrostatiques jouent un rôle dans la phase d'adsorption sur les bicouches lipidiques (Iwase, Lally et al. 1990) et l'adsorption de la toxine sur la membrane cellulaire n'est pas nécessairement suivie d'une lyse cellulaire. Bien que de nombreuses toxines RTX aient une activité hémolytique prononcée *in vitro*, les leucocytes sont les cibles les plus souvent retrouvées. L'extrémité aminée des toxines RTX, qui forme une hélice amphipathique, est le domaine le plus divergent des toxines, ce qui suppose une variation de leur capacité à interagir avec des membranes lipidiques spécifiques chez leurs cellules cibles. Les toxines RTX sont connues pour se lier aux $\beta 2$ -intégrines et à de fortes concentrations en toxines, elles provoquent une nécrose et une lyse cellulaire ou à faibles concentrations, elles induisent l'apoptose. Ceci engendre généralement une inflammation au niveau des tissus qui mène la plupart du temps à une maladie (Dileepan, Kachlany et al. 2007). La spécificité des toxines RTX semble être liée à la spécificité de ces toxines à différentes $\beta 2$ -intégrines.

Les toxines RTX pouvant cibler plusieurs types de cellules, ces dernières ont été classées en différentes classes, dont 3 vont nous intéresser dans cette étude : les hémolysines qui résultent en une lyse des érythrocytes, les leucotoxines qui sont pour la plupart spécifiques à un type de cellule et les toxines MARTX qui sont des hybrides uniques sécrétés indépendamment avec une structure moléculaire spécifique.

2.3.1. Les hémolysines RTX

Les bactéries pathogènes à Gram négatives et les agents commensaux infectant les voies respiratoires, gastro-intestinales, celles du tractus reproducteur, ou des cavités buccales humaines et d'animaux produisent généralement des leucotoxines. Ces toxines largement cytolytiques sont classées pour la plupart comme « hémolysines ». Ces toxines présentent une activité hémolytique *in vitro* révélée par la culture de bactéries correspondantes sur des géloses au sang de mouton. *In vivo*, ces toxines induisent la production de médiateurs inflammatoires ou présentent des effets cytotoxiques et cytolytiques sur les cellules immunitaires hôtes de différentes espèces, induisant ainsi une nécrose, une apoptose et une inflammation. Une des hémolysines RTX les plus connues ainsi que celle qui a servi de référentiel principal lors de cette étude est HlyA.

2.3.1.1. HlyA

HlyA est un polypeptide multi-domaine de 1024 résidus, d'une taille de 110 kDa, libéré par les cellules bactériennes par un mécanisme de sécrétion de type 1. Cette toxine est présente chez certaines souches d'*E. coli* uropathogènes et certaines souches d'*E. coli* commensales fécales (Welch 1991). Malgré le fait que la toxine HlyA est largement présente chez les souches UPEC et NMEC, peu de souches APEC sont connues pour la posséder (Ewers, Li et al. 2007). L'extrémité C-terminale de HlyA contient comme décrit précédemment un signal de sécrétion non clivé, ainsi qu'un domaine RTX, composé de plusieurs unités de nonapeptides riches en glycine et aspartate. L'extrémité N-terminale est, quant à elle, composée de dix α -hélices amphipathiques chargées positivement. Cette région assure l'ancrage irréversible de HlyA sur la membrane plasmique, et contribue ainsi à l'assemblage des pores sur les cellules hôtes, conférant une spécificité aux cellules cibles (Valeva, Siegel et al. 2008).

Le locus *hlyCABD* est généralement localisé sur le chromosome de différents *E. coli* pathogènes, mais peut être situé parfois sur des plasmides chez certains pathotypes. HlyA est une toxine qui possède une majeure activité cytolytique envers les érythrocytes riches en hème.

Cependant, HlyA possède aussi la capacité de lyser d'autres types de cellules hôtes comme les leucocytes, les cellules épithéliales d'animaux et d'humains (Gadeberg, Orskov et al. 1983). Par exemple, lors d'une infection par une souche UPEC, ces souches vont lier les cellules urothéliales et les envahir, et ces bactéries seront expulsées ou pourront entrer dans le cytoplasme et se répliquer (Mulvey, Lopez-Boado et al. 1998). HlyA est capable de dégrader rapidement la paxilline et d'autres protéines de l'hôte responsable des interactions cellules-cellules et cellules-matrice, favorisant donc l'exfoliation (Dhakal and Mulvey 2012).

L'effet d'HlyA est la plupart du temps la conséquence de la liaison de la toxine à des récepteurs sur la membrane de l'hôte, cependant la formation de pores peut également se révéler être indépendante de la présence de récepteurs à la surface cellulaire. En effet, il peut y avoir une adhésion non saturable de la toxine sur les érythrocytes, ce qui a pour conséquence que la liaison peut ne pas se faire par liaison à des récepteurs spécifiques (Valeva, Walev et al. 2005). L' α -hémolysine HlyA a un effet toxique sur les érythrocytes, car ces derniers possèdent des récepteurs spécifiques à HlyA : la glycophorine. L'utilisation de récepteur facilite grandement la liaison des toxines à la membrane. Quand les toxines HlyA, liées au Ca^{2+} , s'attachent à la membrane des cellules hôtes grâce à des forces électrostatiques, le processus de formation de pores commence. Après ceci, chaque unité d'HlyA va se rapprocher les unes des autres ce qui va impliquer d'autres changements conformationnels. Cette phase d'insertion implique un ancrage irréversible des parties du domaine hélicoïdal d'HlyA sur la membrane de l'hôte. Ceci a pour conséquence d'exposer des régions de la toxine qui vont favoriser les interactions protéine-protéine (Herlax, Maté et al. 2009). Ensuite, en fonction du microdomaine et de la teneur en radions lipidique de la membrane de la cellule hôte, les monomères se concentrent et s'oligomérisent de manière dynamique pour former des pores (Bakás, Chanturiya et al. 2006). Le mécanisme de la formation des pores par HlyA est cependant continuellement contesté. Bien qu'il soit considéré comme le principal exemple des toxines RTX, HlyA possède ainsi de nombreuses propriétés uniques qui la distinguent des autres toxines.

L'activité cytotoxique d'HlyA reste également controversée encore à ce jour. *In vitro*, à des concentrations élevées, HlyA se révèle avoir une activité cytotoxique à l'encontre d'une grande variété de cellules. À des concentrations beaucoup plus faibles, HlyA se lie de manière stable à la membrane de l'hôte, ce qui induit des modifications et l'inactivation d'important régulateur comme Akt qui induit la sérine protéase, la méso-trypsine et l'activation des caspases pour contribuer à la virulence des souches pathogènes pour lyser les cellules hôtes (Dhakal and Mulvey 2012). Comme beaucoup d'autres toxines de la famille des RTX, HlyA possède une spécificité

pour les intégrines β_2 . L'activité cytolytique d'HlyA est également fortement influencée par la présence d'hétérodimères d'intégrine CD11a/CD18, appelés LFA-1, qui sont exprimés sur les cellules B et T, les neutrophiles ainsi que sur les monocytes (Lally, Hill et al. 1999). HlyA peut aussi former des pores dans les bicouches lipidiques et les liposomes en absence de récepteurs protéiques, même si ce phénomène ne se produit que dans certains cas selon la composition lipidique de la membrane (Ostolaza, Bartolomé et al. 1993). La capacité d'HlyA à lyser les érythrocytes chargés en fer diminue grandement en présence de protéines sériques de l'hôte (Bhakdi, Greulich et al. 1989).

Grâce à certaines études, un modèle expliquant le mode de fonctionnement des toxines RTX dans la pathogenèse des tissus infectés a pu être créé (Figure 9). Dans un premier temps, les divers types de leucocytes sont recrutés dans la vessie et les reins infectés pour les souches bactériennes pathogènes. Ensuite, HlyA est produit par les UPEC et forme un gradient de toxines. À de faibles concentrations en HlyA, la toxine a des effets cytotoxiques sur les cellules exprimant les intégrines β_2 , mais n'affecte pas les cellules n'exprimant pas les intégrines β_2 . À des concentrations élevées en HlyA, la toxine produit un effet cytotoxique sur les cellules épithéliales n'exprimant pas les intégrines β_2 . La perturbation de la barrière épithéliale résultant de cet effet cytotoxique conduit à une infection accrue (pyélonéphrite et urosepsie). Pour les souches UPEC colonisant le tractus urinaire et qui exprime HlyA, les leucocytes sont potentiellement les premières cellules touchées par la toxine. C'est ainsi que les toxines RTX produisent une attaque globale des réponses immunitaires innée et adaptative.

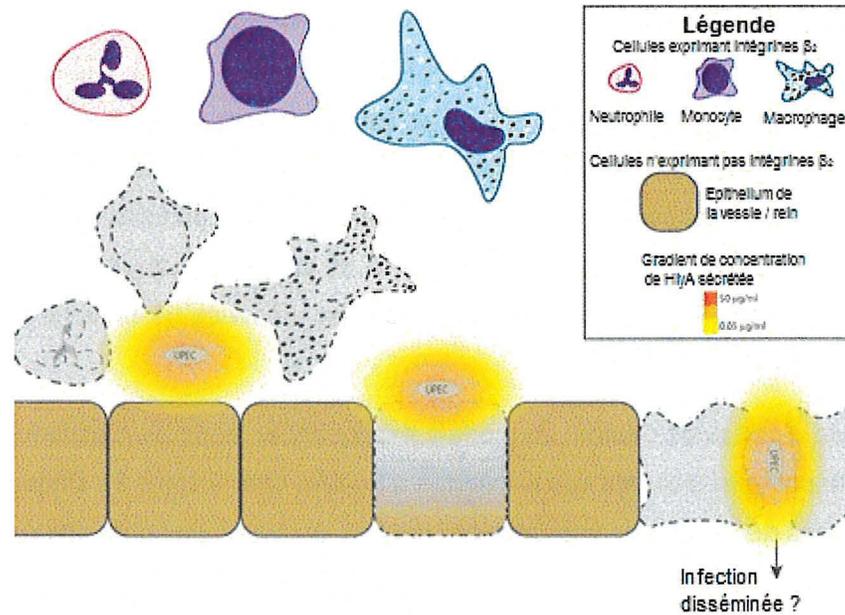


Figure 9 : Modèle d'activité cytotoxique de la toxine HlyA dans les tissus infectés (vessie, reins, ...). Adapté de (Ristow, Tran et al. 2019).

2.3.1.2. EhxA

Une des autres hémolysines bien connue dans la littérature est EhxA. EhxA est codée par l'opéron *ehxCABD* se trouvant sur le plasmide de virulence pO157 de 90 kbp de la souche EHEC O157:H7 et produit une protéine, EhxA de 107 kDa qui possèdent une identité de 61% avec HlyA. EhxA est produite par les isolats EHEC qui provoquent des diarrhées, des colites hémorragiques ou un syndrome hémolytique et urémique (Karch, Tarr et al. 2005). Comme HlyA, EhxA possède aussi un domaine N-terminal hydrophobe qui sert à l'insertion de la toxine dans la membrane des cellules hôtes afin de former des pores. EhxA possède 2 sites d'acylation qui servent à rendre la toxine active : Lys550 et Lys675. De plus cette toxine est composée d'un réseau de 13 répétitions de nonapeptides, et utilise un SST1 afin d'être excrétée dans le milieu extracellulaire (Schmidt, Beutin et al. 1995).

La toxine EhxA de la souche d'*E. coli* O157:H7 peut être retrouvé sous forme libre ou liée avec les vésicules de la membrane externe (OMV) indépendamment de l'acylation de la toxine, la forme liée à l'OMV étant la plus commune (Aldick, Bielaszewska et al. 2009). Cette fixation de la toxine EhxA se fait par la grande affinité de cette dernière avec les OMV. De façon générale, quand EhxA est sous forme libre elle lyse les cellules cibles en formant des pores dans la membrane. Cependant quand EhxA se trouve sous forme liée à l'OMV, la toxine est internalisée

induisant des dommages aux mitochondries ce qui amène à l'apoptose (Bielaszewska, Aldick et al. 2014). Le fait d'induire l'apoptose des cellules au lieu de les lyser est que de ce fait, il n'y a pas de sécrétion d'IL-1 β des macrophages, ainsi il n'y a pas d'inflammation dans la cellule hôte ce qui aide à la virulence des EHEC (Kesty, Mason et al. 2004).

EhxA est capable de lyser les érythrocytes humains et ovins, mais n'est capable de ne lyser que les lymphocytes bovins. EhxA possède une forte affinité pour les cellules endothéliales, épithéliales et microvasculaires intestinales humaines (Aldick, Bielaszewska et al. 2007). Néanmoins, EhxA possède 100 fois moins d'affinité et une activité spécifique 40 fois plus faible pour les érythrocytes que la toxine HlyA, et elle ne possède qu'une très faible activité pour les lignées cellulaires de lymphomes humaines et les érythrocytes humains. EhxA existe sous deux formes biologiquement actives, l'une comprenant une protéine EhxA libre et soluble et l'autre associée aux OMV libérées lors de la croissance des souches EHEC. Une fois qu'EhxA est acylé, il peut ensuite se fixer aux OMV, qui sont internalisées via endocytose afin d'être stocké dans des compartiments endo-lysosomaux. Quand le pH diminue dans les endosomes, EhxA se détache des OMV, s'échappe des lysosomes pour aller cibler les mitochondries (Figure 10). Une fois dans les mitochondries, EhxA induit une réduction du potentiel de la membrane mitochondriale, ce qui engendre une libération du cytochrome c dans le cytosol et une activation des caspases 9 et 3 qui conduiront à la mort cellulaire apoptotique (Bielaszewska, Rüter et al. 2013). Le potentiel pro-inflammatoire de EhxA pourrait contribuer à la pathogenèse des EHEC par la libération de la cytokine pro-inflammatoire interleukine-1 β à partir de cellules monocytes/macrophages humaines (Taneike, Zhang et al. 2002).

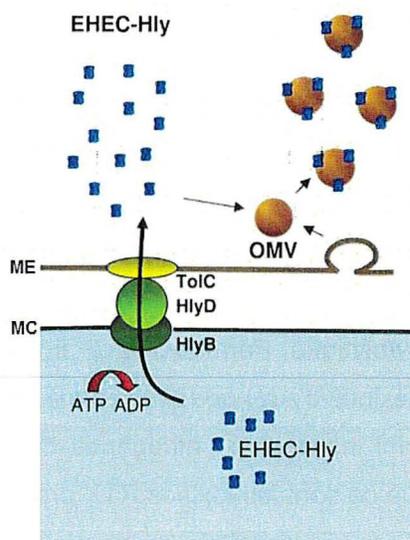


Figure 10 : Sécrétion et association de EhxA (EHEC-Hly) avec les OMV (Bielaszewska, Aldick et al. 2014).

2.3.1.3. TosA

TosA quant à elle, est une autre toxine découverte plus récemment que les autres, mais qui semble quand même jouer un rôle important dans la pathogénèse. TosA (protéine de sécrétion de type 1 A) est une adhésine, et elle est codée par l'opéron *tos*. Cet opéron est localisé sur l'îlot de pathogénicité *aspV* (PAI-*aspV*), comme chez la souche UPEC CFT073, et est présent chez le quart des souches UPEC (Lloyd, Henderson et al. 2009). L'opéron *tosCBDAREF*, fait partie du locus *tos* et ces gènes sont bien conservés parmi les souches UPEC codant également pour *tosA*. De plus, les gènes régulateurs sont aussi largement conservés chez les UPEC possédant *tosA*, suggérant une importance de ces régulateurs dans la *fitness*, et la structure typique de l'opéron est représentée par *tosRCBDAEF* (Engstrom 2016).

TosA est une adhésine non fimbriaire, qui est localisé au niveau de la membrane externe et permet l'adhérence spécifique aux cellules des voies urinaires supérieures grâce à des récepteurs à la surface de ces cellules (Xicohtencatl-Cortes, Cruz-Córdova et al. 2019). La plupart des toxines de la famille des RTX sécrètent les toxines dans le milieu extracellulaire, tandis que les toxines RTX de ce groupe, tout comme les toxines de la couche S, restent associées à la bactérie. TosA est un facteur de virulence important pour la létalité des souches, et a été identifié pour jouer un rôle dans le passage de la toxine de l'appareil urinaire vers le système sanguin. TosA joue également un rôle dans la survie cellulaire lors de bactériémie et de l'urosepsie (Vigil, Wiles et al. 2012).

2.3.1.4. Les toxines des *Pasteurellaceae*

La plupart des membres de la famille *Pasteurellaceae* sont des espèces commensales qui colonisent les muqueuses des voies respiratoires supérieures, de l'appareil digestif, de la cavité buccale et du tractus reproductif (Kuhnert, Scholten et al. 2010). Cependant, certaines souches peuvent être des pathogènes opportunistes ou peuvent infecter plusieurs espèces. La famille *Pasteurellaceae* contient plusieurs espèces qui sécrètent plusieurs types de toxines et d'hémolysines RTX à activité cytolytique. Parmi celles-là, il y a les toxines d'*Actinobacillus* sp. ApxIA, ApxIIA et ApxIIIA, et les toxines d'*Actinobacillus equuli* AqxA (Frey 2011). Les toxines RTX étant largement répandues parmi les agents pathogènes des bactéries Gram négatives, des études génétiques suggèrent que ce sont les toxines RTX provenant des *Pasteurellaceae* qui se sont répandues à d'autres bactéries par transferts horizontaux (Frey 2011, Frey 2019).

Les toxines RTX Apxl, ApxII et ApxIII jouent un rôle prédominant dans la pathogénicité des souches d'*Actinobacillus pleuropneumoniae*, qui causent la pleuropneumonie porcine et ces facteurs sont essentiels à la virulence de ces souches. Les toxines Apxl, ApxII et ApxIII sont codées sur les opérons polycistroniques *apxI/CABD*, *apxII/CA* et *apxIII/CABD*, respectivement (Frey 2011). Une quatrième toxine RTX, ApxIVA, a été découverte et elle est commune et spécifique à tous les sérotypes d'*A. pleuropneumoniae* (Schaller, Kuhn et al. 1999). Elle a été caractérisée comme étant essentielle pour la virulence d'*A. pleuropneumoniae* et possède les mêmes propriétés que la protéine RTX, FrpC de *Neisseria meningitidis* (Osička, Procházková et al. 2004).

Les toxines Apx vont généralement induire de fortes réactions immunologiques chez les porcs infectés et sont utilisées comme antigènes dans les vaccins pour induire une immunité afin de protéger les porcs contre la pleuropneumonie porcine. De plus ces toxines Apx sont également utilisées, de par leurs propriétés antigéniques, afin de réaliser des sérodiagnostics d'infections à *A. pleuropneumoniae* (Kobisch and Van den Bosch 1992).

Pour la cytotoxicité des toxines Apx par exemple, ApxIII est spécifiquement cytotoxique pour des cellules mononucléées du sang périphérique des porcs et sangliers. La sécrétion des toxines dépend du sérotype des souches. ApxIIIA et PaxA ne sont pas hémolytiques sur les érythrocytes, cependant elles démontrent une activité cohémolytique (Kuhnert, Scholten et al. 2010). ApxIIIA possède en revanche une activité très forte contre les macrophages. L'activité cytotoxique de PaxA n'est pas connue, mais toutes les souches virulentes isolées expriment le gène *paxA*, tandis que les souches n'ayant pas *paxA* sont soit des souches commensales ou des pathogènes opportunistes. Les toxines Apx sont considérées comme des facteurs de virulence importants, car des études ont montrées que des mutants d'Apxl et ApxII de certains sérotypes d'*Actinobacillus pleuropneumoniae* ne causent aucun dommage aux macrophages ni aux neutrophiles, et ne causent pas de maladies ou lésions pulmonaires chez des porcs.

2.3.2. Les leucotoxines

Les leucotoxines RTX ne semblent être actives que sur un groupe restreint de cellules de manière spécifique à une espèce (Henderson, Nair et al. 2003). LktA et LtxA possèdent aussi une activité hémolytique détectable (Balashova, Diaz et al. 2006). LktA qui est produit par *M. haemolytica* a une activité cytolytique qui est fortement limitée aux leucocytes et aux plaquettes des ruminants (Brown, Leite et al. 1997). LtxA qui est produit par *A. actinomycetemcomitans* se lie seulement aux leucocytes et granulocytes humains, des hominidés et des cercopithécidés.

2.3.2.1. LktA et LtxA

LktA joue un rôle dans la pathogénèse de la pasteurellose pneumonique bovine et ovine , alors que LtxA est le principal facteur de virulence de la parodontite agressive localisée chez l'homme (Jeyaseelan, Sreevatsan et al. 2002, Fine, Kaplan et al. 2006). Ces deux toxines ont la capacité d'inhiber la mobilité et la chimiotaxie des neutrophiles, mais également de libérer des médiateurs inflammatoires des granulocytes et des macrophages, de prévenir la phagocytose par les cellules polymorphonucléaires et de permettre l'invasion bactérienne du phagosome lors de sa perturbation. Tous ces effets ont pour conséquence de réduire fortement la réponse immunitaire des hôtes infectés (Balashova, Park et al. 2007). LtxA est par ailleurs capable de réagir avec la superoxyde dismutase Cu/Zn et protège ainsi la bactérie des espèces réactives de l'oxygène produit lors de la réponse inflammatoire de l'hôte.

Les leucotoxines RTX cytolytiques sont des protéines de poids moléculaire compris entre 100 et 120 kDa, possédant des domaines structuraux et fonctionnels et sont codées par des opérons rtx similaires à ceux des hémolysines RTX. LtxA partage une homologie d'acides aminés de 40 à 50% avec HlyA et LktA. De manière similaire, les proLktA et proLtxA non-acylés sont capables de se lier aux cellules cibles sans induire de cytolyse (Balashova, Shah et al. 2009). Cependant, les proLktA peuvent être acylés par des acétylases d'autres toxines RTX comme HlyC, CyaC et LtxC. Il a été également démontré que LktA posséderait un second site d'acylation fonctionnellement redondant (Pellett and Welch 1996). Les domaines RTX de liaison au calcium de LktA et LtxA sont plus courts que ceux d'HlyA et ne contiennent que sept et huit répétitions. Pour LtxA la reconnaissance des cellules cibles humaines se fait au niveau de la région de répétitions riche en glycine, tandis que pour LktA la reconnaissance des cellules de ruminants se fait au niveau de la partie N-terminale de la toxine (Thumbikat, Briggs et al. 2003).

La spécificité de certaines toxines comme LtxA et LktA pour certains hôtes spécifiques suggère que les toxines RTX exercent leurs effets cytotoxiques, protéolytiques ou lipolytiques en se liant aux récepteurs de la surface cellulaire. Il est connu également que ces toxines possèdent des domaines spécialisés dans la reconnaissance des cellules cibles (Lally, Hill et al. 1999). L'interaction avec un récepteur cellulaire déclenche un processus en plusieurs étapes qui aboutit à la mort cellulaire. Bien que les membres de la famille des toxines RTX soient homologues, ils présentent toujours des tropismes cellulaires distincts. Cela laisse à penser que les RTX comme les hémolysines et les cytolysines utilisent probablement différents domaines ou stratégies pour obtenir la formation de pores dans différents types de cellules. En général, les hémolysines RTX

semblent reposer sur des interactions électrostatiques pour se fixer sur les membranes cellulaires et certains domaines tels que la région répétée ne semblent pas nécessaires pour la lyse cellulaire (Welch 2001).

La gamme d'hôtes assez étroite des leucotoxines semble être due à la liaison spécifique des cellules par les intégrines $\beta 2$ (Vega, Belinka Jr et al. 2019). LktA ne possède pas d'activité cytotoxique pour les neutrophiles souffrant d'un déficit d'adhérence (NAGAHATA 2004). LtxA quant à elle interagit avec les antigènes 1 associés aux fonction lymphocytaire ou sur les intégrines $\beta 2$, ce qui déclenche des voies de signalisation intracellulaires conduisant à la mort cellulaire. Le mécanisme de mort cellulaire varie selon le sous-ensemble de cellules immunitaires (Vega, Belinka Jr et al. 2019).

2.3.2.2. CyaA

La toxine CyaA produite chez de nombreuses *Bordetella* est composée de 1706 résidus et est unique parmi les leucotoxines RTX car c'est une toxine bifonctionnelle : cette toxine possède une capacité à former des pores comme les autres toxines RTX, mais il y a en plus sur l'extrémité N-terminal, un domaine fonctionnel d'adénylate cyclase (AC) qui permet l'invasion cellulaire. CyaA est constituée de différents segments : un domaine hydrophobe de formation de pores comprenant les résidus 500 à 800 (Benz, Maier et al. 1994) ; un domaine d'activation, où se produit la palmitoylation post-traductionnelle des résidus de lysine 860 et 983 de CyaA (Hackett, Walker et al. 1995) ; et un domaine RTX composé de répétitions de nonapeptides, avec la séquence consensus X(L/I/F)XGGXG(N/D)D (où X correspond à n'importe quel acide aminé) qui lie le calcium (Bauche, Chenal et al. 2006). CyaA diffère des autres toxines par le fait qu'elle possède des activités cytotoxiques et hémolytiques ainsi que par son assemblage en oligomère (Knapp and Benz 2020).

Chez CyaA de *Bordetella pertussis*, la formation de pores par ses toxines se fait grâce à une interaction avec la membrane cellulaire de l'hôte via des récepteurs (Lally, Kieba et al. 1997). CyaA est susceptible de reconnaître les N-oligosaccharides des récepteurs apparentés aux intégrines $\beta 2$ (αM ou CD11b), et la perte de cet attachement des récepteurs induit une perte d'activité de la toxine. On suppose que la fixation de Ca^{2+} sur CyaA induit la fixation aux récepteurs $\beta 2$ (αM ou CD11b) et entraîne un endocytose, protégeant ainsi la bactérie du système immunitaire (Bretscher 1992). Les érythrocytes ne possèdent pas de récepteurs $\beta 2$ intégrine, mais étant donné que les toxines reconnaissent la partie glycosylée des récepteurs, la lyse des globules rouges est toujours possible puisque ces cellules possèdent des récepteurs glycosylés nécessaires pour la liaison des gangliosides par CyaA (Morova, Osicka et al. 2008). La

reconnaissance de sucre à la surface des érythrocytes expliquerait donc le manque de spécificité de la reconnaissance des érythrocytes provenant de différentes espèces (Thomas et al., 2014).

CyaA cible principalement avec une grande efficacité les leucocytes exprimant l'intégrine $\alpha M\beta 2$ (CD11b / CD18). Cependant, la toxine peut aussi pénétrer dans d'autres cellules dépourvues de cette intégrine. Contrairement aux autres toxines RTX, qui pénètrent dans le cytosol des cellules par les endosomes, CyaA passe directement à travers la membrane cytoplasmique sans besoin avoir recours à l'endocytose (Basler, Masin et al. 2006). Une fois dans le cytosol, CyaA se lie à la calmoduline intracellulaire, ce qui catalyse la conversion non contrôlée de l'ATP en AMPc. Ceci compromet la signalisation de la protéine kinase A, élimine les fonctions bactéricides des phagocytes et induit la sécrétion de cytokines immunomodulatrices (Vojtova, Kamanova et al. 2006). Le dérèglement de l'AMPc par CyaA permet également une inhibition de la phagocytose des cellules de *B. pertussis* via les récepteurs des neutrophiles (Weingart and Weiss 2000). Ceci engendre ainsi une perte des capacités chimiotactique et oxydante nécessaires à l'activité bactéricide des leucocytes, et peut aussi engendre l'apoptose des macrophages par la perturbation du potentiel de la membrane des mitochondries. CyaA possède une activité relativement faible comparée à HlyA, cependant il existe une synergie avec l'activité invasive de l'adénylate cyclase pour maximiser le potentiel cytotoxique global de CyaA sur les cellules CD11b (Basler, Masin et al. 2006). CyaA est connu pour avoir de nombreux effets pathologiques dans un modèle d'infection pulmonaire murin.

2.3.3. Les toxines MARTX

Les toxines MARTX sont un groupe de très grandes toxines qui diffèrent des autres toxines RTX du fait que ce sont des hybrides uniques sécrétés indépendamment, et de par leurs structures moléculaires. Les toxines MARTX sont sécrétées sous forme de polypeptides simples d'environ 3500 à 5300 acides aminés, qui contiennent des séquences répétées riches en glycine conservées aux extrémités N et C-terminales bordant de multiples domaines effecteurs (Satchell, Jones et al. 2016). Les séquences répétées riches en glycine sont impliquées dans la formation de pores dans la membrane plasmique de cellules eucaryotes afin de transloquer les effecteurs et la cystéine protéase à auto-traitement (CPD) dans la cellule cible. Une fois entrée dans le cytoplasme, la CPD est activée par liaison de l'hexakisphosphate d'inositol de l'hôte (InsP6), puis auto-clivée pour libérer les domaines effecteurs de la grande holotoxine. Les différents effecteurs peuvent ensuite traverser la cellule pour cibler les cellules cibles et remplir leurs fonctions catalytiques (Woida and Satchell 2019).

Ces toxines sont retrouvées chez *Aeromonas hydrophila*, *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia kristensenii*, chez différentes espèces de *Vibrio* ainsi que chez *Proteus mirabilis*, *Photobacterium luminescens* et *Photobacterium asymbiotica* (Li, Rock et al. 2008). Tous les gènes de MARTX de type *rtxA* codent pour des protéines de 3212 à 5206 acides aminés. La différence chez ces toxines se situe sur l'extrémité C-terminale qui possède une séquence consensus de 18 acides aminés X(V/I)XXGXXNX(V/I)XXGDGXDX (où X correspond à n'importe quel acide aminé) et sur la répétition de nonapeptides qui possède un autre motif central qui est G-7X-GXXN (Satchell 2007). Au niveau de l'extrémité N-terminale, les toxines MARTX possèdent des répétitions supplémentaires qui peuvent être deux séquences consensus différentes. La zone de répétition riche en glycine de ces toxines fait le quart de la séquence et est responsable de la liaison des toxines à la surface des cellules eucaryotes et facilite la translocation vers le cytosol. La partie centrale qui est transloquée dans le cytoplasme de la cellule est composée de différents domaines, selon le type de toxine (Boardman and Satchell 2004). La toxine MARTX la plus étudiée est RtxA de *V. cholerae*, renommé MARTX_C (Satchell 2007). Malgré quelques exceptions, l'activité biologique et la fonction des toxines MARTX restent inconnues.

Les toxines MARTX de *V. cholerae* sont généralement composées de deux opérons divergents : *rtxHCA* et *rtxBDE*. L'opéron *rtxBDE* est régulé par un répresseur codé hors du locus *rtx*. La toxine MARTX de *V. cholerae* est capable de s'auto-réguler ainsi que de réduire la réponse de l'hôte lors de l'infection. La sécrétion de la toxine MARTX_C dépend également de la phase de croissance : la toxine est produite et sécrétée pendant la phase logarithmique de croissance, puis la toxine est dégradée par les protéases sécrétées pendant la phase stationnaire (Woida and Satchell 2020). De plus, les toxines MARTX sont sécrétées par des SST1 qui sont différents de ceux utilisés généralement. Ces SST1 atypiques sont régulés par la phase de croissance de la bactérie exprimant MARTX. MARTX_C est une protéine de 4545 acides aminés, avec une taille de 485 kDa (Lin, Fullner et al. 1999). MARTX_C ne peut cependant pas perturber l'intégrité de la membrane ou causer la mort cellulaire, mais contribue à la gravité des réponses inflammatoires en induisant une altération de perméabilité des jonctions serrées paracellulaires. Ceci engendre un arrondissement et une dépolymérisation des cellules du cytosquelette d'actine sans avoir d'impact sur la viabilité de ces cellules (Cordero, Kudryashov et al. 2006).

MARTX_V de *V. vulnificus*, quant à elle, est une protéine de 5206 acides aminés codée par le gène *rtxA1* et est l'un des facteurs de virulence les plus importants pour la pathogène (Lee, Kim et al. 2007). La toxine MARTX_V est une toxine composite possédant 5 domaines effecteurs en plus des séquences répétées. La séquence d'acide aminé de MARTX_V possède une

homologie de 80-90% avec MARTXV_C, mais ne possède pas d'ACD et donc il n'y a pas de réticulation de l'actine, mais possède le domaine CPD. MARTXV_V est capable de rompre les membranes, présente une activité cytolytique et est très importante pour la virulence de la souche (Lee, Kim et al. 2007). La toxine MARTXV_V possède des effets cytotoxiques et cytopathiques sur les cellules eucaryotes, et engendre la nécrose, l'apoptose, l'induction d'espèces réactives de l'oxygène, ainsi que la dépolymérisation de l'actine (Kim, Gavin et al. 2015).

2.4. Système de sécrétion de type 1

L'enveloppe des bactéries à Gram négatives est composée d'une membrane interne et d'une membrane externe, séparées par un espace périplasmique (Buchanan 2001). Les protéines transmembranaires de la membrane interne supportent le transport de nutriments, la translocation de protéines et fournissent l'énergie à la bactérie. La membrane interne quant à elle, présente une bicouche lipidique asymétrique composée de lipopolysaccharides reliées grâce à du peptidoglycane, permet le transport de nutriments à l'intérieur de la cellule ou encore l'export de déchets cellulaires. La membrane externe est imperméable aux molécules d'une taille supérieure à 600 Da, ce qui permet de protéger la bactérie de molécules nuisibles de l'extérieur de la cellule (Buchanan 2001).

Les SST1 sont présents chez un grand nombre de bactéries Gram négatives commensales ou pathogènes. Ces systèmes permettent le transport de substrats grâce à un processus en une étape à travers les membranes bactériennes (Thomas, Holland et al. 2014). Le système de sécrétion de type 1 dépendant du transporteur ABC, mais généralement indépendant du système Sec, présente quelques singularités dont sa simplicité comparée à d'autres systèmes de sécrétion, qui exporte de petites molécules comme des antibiotiques et des toxines hors de la cellule bactérienne (Holland 2004, Symmons, Bokma et al. 2009). Certaines bactéries possèdent plusieurs SST1 qui sont spécifiques au transport d'un ou plusieurs substrats qui peuvent être des lipases, des protéases, des adhésines ou encore des toxines RTX. Les substrats du SST1 contiennent généralement une séquence signal au niveau de la queue C-terminale qui est reconnue par le SST1.

Les SST1 sont composés des 3 composants essentiels : une protéine de transport ABC au niveau de la membrane interne, une protéine de fusion membranaire (MFP) qui passe à travers la membrane interne et qui va jusqu'au facteur de membrane externe (OMF) au niveau de la membrane externe (Thomas, Holland et al. 2014). Le transporteur ABC sert à catalyser l'ATP pour énergiser le transport du substrat à travers le SST1 et il permet la reconnaissance du substrat. Le

MFP s'associe au transporteur ABC au niveau de la membrane interne mais aussi avec le OMF dans le périplasma, et l'extrémité N-terminale du MFP rentre en compte pour la sélection du substrat (Lee, Jun et al. 2012). L'OMF quant à lui est utile pour le transport du substrat dans le milieu extracellulaire car il permet de générer des pores au niveau de la membrane externe. Les SST1 sont aussi connus pour leur dépendance à la protéine TolC qui participe à exporter le substrat. Ce système est ainsi indirectement Sec-dépendant, car les précurseurs de TolC sont exportés au périplasma par un système de sécrétion Sec-dépendant (Delepelaire 2004).

Parmi les transporteurs ABC, il existe 3 différents groupes en fonction de leurs séquences N-terminales (Kanonenberg, Schwarz et al. 2013). Une des classes possède un domaine de la peptidase C39, qui appartient à la famille de la papaïne, qui est nécessaire à la reconnaissance et au clivage des extrémités N-terminales des substrats. Un des exemples de cette classe de transporteur ABC est CvaB responsable de la sécrétion de la colicine V d'*E. coli* (Wu and Tai 2004). La deuxième classe de transporteurs ABC possède quant à elle un domaine similaire à la peptidase C39 qui est dépourvu d'activité protéolytique (CLD). Ce dernier est beaucoup plus grand que ceux de la première classe et possède généralement des motifs RTX. Ces motifs RTX peuvent se lier au calcium de manière uniquement extracellulaire et favorisent le repliement des substrats et permettent aux substrats de rester dépliés à l'intérieur des cellules (Linhartová, Bumba et al. 2010). La troisième classe de transporteurs ABC ne contient pas de séquence supplémentaire au niveau du domaine N-terminal, les substrats de cette classe sont généralement plus petits que ceux de la classe CLD et peuvent posséder ou non des motifs RTX. Leur spécificité cependant est la présence de signaux de sécrétion au niveau des extrémités C-terminales (Delepelaire 2004).

2.4.1. Transporteurs ABC

Les transporteurs ABC comprennent 4 domaines centraux qui sont généralement constitués de différents polypeptides pour chaque domaine (Higgins, Hiles et al. 1986). Dans le cas éventuel où l'un des domaines est endommagé ou absent, un des domaines restants compensera en agissant comme un homodimère (Davidson and Nikaido 1991). Les deux domaines transmembranaires (TMD) couvrent la membrane de multiples fois grâce à des hélices α , et il existe en général 6 hélices transmembranaires par domaine. Certaines des hélices couvrant la membrane ne sont pas essentielles pour la fonction du transporteur, mais peuvent cependant contribuer à d'autres fonctions auxiliaires comme l'insertion ou la régulation de la membrane. Les TMD déterminent la spécificité des transporteurs grâce aux sites de liaison au

substrat et forment des pores par lesquels les solutés peuvent transiter entre les cellules. Les deux autres domaines sont des domaines de liaison aux nucléotides (NBD), qui sont hydrophiles et s'associent à la membrane interne, qui permettent l'hydrolyse de l'ATP avec l'aide du cofacteur Mg^{2+} et qui sont importants pour la différenciation des différentes familles (Higgins, Hiles et al. 1986).

Pour un grand nombre de transporteurs ABC, des domaines auxiliaires ont diverses fonctions. Les protéines de liaison périplasmiques (PBP) se lient à leur substrat dans le milieu extracellulaire et permettent de l'amener jusqu'au complexe de transport situé sur la membrane externe. Chez les bactéries Gram positives qui ne possèdent pas de membrane externe, il existe des équivalents à ces protéines qui sont ancrés à l'extérieur de la cellule via des liaisons à des groupes lipidiques (Perego, Higgins et al. 1991). Les PBP confèrent une forte affinité et spécificité comparée aux autres transporteurs qui en sont dépourvus. La structure globale des transporteurs ABC est encore inconnue, quoique les structures de certains domaines aient été caractérisées (Figure 11).

De façon générale, les TMD forment un anneau dans la membrane, qui provoque une ouverture vers le milieu extracellulaire, mais en restant fermé au niveau de la face cytoplasmique. Les NBD se situent quant à eux sur la membrane cytoplasmique en juxtaposition étroite avec les domaines membranaires. Cette structure a été proposée comme architecture générale des transporteurs ABC en adéquation avec des données biochimiques et génétiques. La structure diffère des autres ATPases à translocation membranaire (comme la F_1F_0 ATPase) de deux façons distinctes : les TMD forment un pore large au niveau de la membrane, en corrélation avec le fait que les transporteurs ABC sont connus pour transporter des substrats volumineux, comparément aux hélices α qui sont extrêmement compactes. De plus, les NBD chez les transporteurs ABC se retrouvent en association avec les TMD, alors que pour les ATPases à translocation membranaire ces derniers sont séparés, même si cette observation n'a pas de conséquence connue pour l'instant. Par ailleurs, les données structurales ont des implications sur les mécanismes de transport, mais l'absence d'une structure précise des TMD limite la compréhension du fonctionnement des transporteurs ABC.

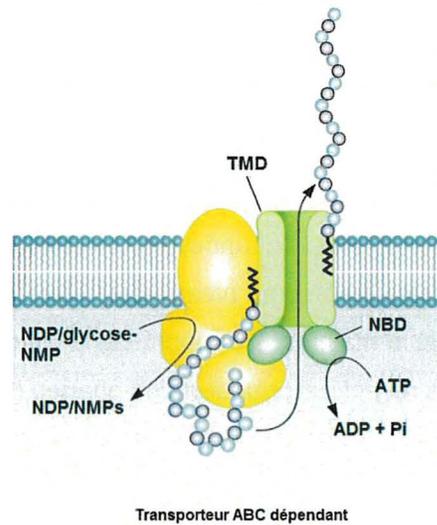


Figure 11 : Structure des transporteurs ABC. Adapté de (Cuthbertson, Kos et al. 2010).

2.4.2. TolC

La protéine TolC est aussi impliquée dans les SST1. TolC est une protéine de 55 kDa qui permet de jouer le rôle de pompe d'efflux pour l'export de protéines de grandes tailles comme les toxines ou les enzymes. Elle permet également l'export de molécules nuisibles tels les antibiotiques, des solvants organiques et des détergents. TolC permet grâce à l'aide d'une translocase de membrane interne, une ATPase et d'une protéine « adaptatrice », l'export tout en évitant le périplasma (Koronakis, Li et al. 1997). TolC est un cylindre homotrimérique creux effilé d'une longueur de 140 ångströms, composé d'un tonneau β de membrane externe de 40 ångströms (domaine du canal) qui est fixé à un long tonneau de α hélices situé dans l'espace périplasmique (domaine du tunnel). Un troisième domaine composé d'un complexe de structures α/β forme une ceinture à l'équateur du tunnel. TolC est un baril à 12 brins. Chacun des trois monomères fournit quatre brins β -antiparallèles et quatre brins α -antiparallèles (deux hélices continues longues et deux paires d'hélices plus courtes) pour former respectivement les domaines « canal » et « tunnel » (Figure 12) (Koronakis, Eswaran et al. 2004).

Bien que les tonneaux β soient généralement des protéines de la membrane externe, le domaine canal de la protéine TolC est unique en ce sens que le trimère forme un seul grand tonneau β (Koebnik, Locher et al. 2000). Le tonneau β de la membrane externe de TolC est ouvert de manière constitutive au milieu extérieur, car il lui manque la boucle repliée qui resserre les tonneaux β , comme ceux présents chez OmpA (Saint, Lou et al. 1996). Cependant, la

caractéristique la plus distinctive de TolC est le tunnel périplasmique qui est un tonneau α composé de 12 hélices α antiparallèles (4 pour chaque monomère). Ce tonneau α est stabilisé par enchevêtrement de chaînes latérales et possède également deux hélices voisines. Dans la moitié supérieure, les hélices α sont sous-enroulées tandis que dans la moitié inférieure, les hélices voisines forment 6 paires de bobines enroulées à deux brins. À l'extrémité périplasmique, une bobine de chaque monomère se replie vers l'intérieur, resserrant le tunnel et ne permettant pas le passage d'ions ou de protéines. Le tunnel est consolidé par des liaisons d'hydrogène entre les hélices α , et des ponts salins formés au niveau des monomères pouvant jouer un rôle dans la trimérisation. TolC peut aider à maintenir l'intégrité de la membrane externe, importer certaines colicines, ainsi que servir de récepteur pour certains phages (Delepelaire 2004).

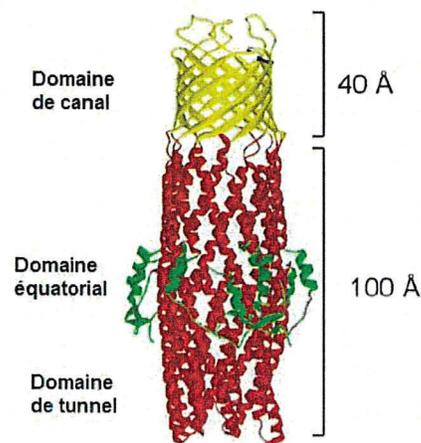


Figure 12 : Vue d'ensemble de la structure de TolC. Adapté de (Hotz 2008).

3. Hypothèses et objectifs

Escherichia coli est une bactérie commensale qui colonise l'intestin et fait partie du microbiote normal chez les humains. Cependant, certaines souches ont la capacité de causer des infections entériques et des infections extra-intestinales telles que les infections urinaires, la septicémie et la méningite. Ces souches sont dites ExPEC (Extra-intestinal Pathogenic *E. coli*). Parmi ces ExPEC, on peut trouver différents types de souches comme les UPEC ou APEC en fonction des organes ou organismes atteints. Les souches d'*E. coli* uropathogènes causent près de 90% des infections urinaires communautaires et plus de 50% des infections urinaires chez les patients en hôpital. Ces souches pathogènes possèdent plusieurs mécanismes de virulence et un de ces mécanismes est la production de toxines. Un nouveau système de toxine de type RTX a été identifié, dans le laboratoire du professeur C. Dozois, sur un plasmide de type ColV chez une souche d'*Escherichia coli* qui a été isolée d'une dindonneau de 4 jours. La caractéristique de cette souche d'APEC est qu'elle ne possède pas le gène de l'aérobactine, qui est un facteur de virulence important chez ces souches. La souche étant tout aussi virulente que celles possédant l'aérobactine, l'hypothèse a été que ce nouveau système de RTX présent sur ce plasmide ColV (pEC598) est responsable de la virulence chez cette souche APEC. Le système a été nommé Prt. Ainsi la caractérisation de ce nouveau système de toxine RTX est importante afin de mieux comprendre les mécanismes régissant les facteurs de virulences de ces bactéries. Cette étude vise à améliorer la compréhension de cette toxine RTX dans le but d'éventuellement en faire une cible thérapeutique pour limiter l'utilisation d'antibiotiques.

Les toxines de la famille des RTX peuvent s'organiser génétiquement de différentes façons possibles. Il existe différents types de toxines RTX qui peuvent avoir des activités cytotoxiques ou cytolytiques ainsi que cibler différents types de cellules (érythrocytes, macrophages, ...) ce qui induit une libération du contenu de ces cellules cibles. Des études préliminaires ont montré une lyse des érythrocytes sur gélose au sang démontrant ainsi une activité hémolytique. L'un des objectifs a donc été de caractériser génétiquement l'agencement et la similarité avec des toxines RTX connues de ce nouveau système RTX. Pour ce faire, les séquences protéiques des codées par les gènes *prtCABD* ont été obtenues afin de pouvoir être comparées avec d'autres séquences de RTX connues afin de déterminer si l'on avait bien affaire à une nouvelle protéine RTX. Un autre objectif a été de déterminer si cette nouvelle toxine RTX possède une spécificité d'hôte ou bien si elle avait la capacité de cibler une large gamme de cellules. Les études préliminaires montrant une activité hémolytique sur gélose au sang, plusieurs tests ont été réalisés afin de déterminer si une activité hémolytique sur du sang de différents animaux pouvait être retrouvée. Enfin le dernier

objectif a été de caractériser l'importance ou non de cette nouvelle toxine lors d'infection de poussins et de souris. Cet objectif a été réalisé en infectant des modèles de poussin avec des souches pathogènes d'*E. coli* possédant le plasmide pEC598, des mutants de l'opéron *prtCABD* ainsi que les souches mutées complémentées de cet opéron afin de voir l'importance dans l'infection de cette nouvelle toxine.

4. Matériels et Méthodes

Cette partie est un résumé, les détails manquants seront présentés au sein de l'article en partie 5.

4.1. Souches bactériennes, milieux et conditions de croissance

Les bactéries ont été cultivées 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.). 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 II ci-dessous. L'ampicilline est utilisée à une concentration de 100 µg/mL, 30 µg/mL pour le chloramphénicol, la gentamicine à hauteur de 15 µg/mL et la kanamycine à 50 µg/mL.

Les souches utilisées lors des expériences sont présentées au Tableau II et les amorces utilisées lors des clonages ainsi que les sites de restriction présents et la séquence des amorces se trouvent au Tableau III.

Tableau II : Liste des souches utilisées ainsi que leur résistance aux antibiotiques

Code inventaire	Caractéristiques	Références
pGP Tn7 Cm	pGP-Tn7-FRT::Cm	(Crépin, Harel et al. 2012)
pIJ258	pST76K <i>tnsABCD</i> (transposase Tn7)	(Crépin, Harel et al. 2012)
pIJ360	pIJ258 + Km	(Crépin, Harel et al. 2012)
pIJ361	pIJ258 + Cm	(Crépin, Harel et al. 2012)
pIJ479	pUCm-T <i>prtCABD</i>	Cette étude
pIJ489	pIJ479 Δ <i>prtC</i>	Cette étude
pIJ490	pIJ479 Δ <i>prtA</i>	Cette étude
pIJ491	pIJ479 Δ <i>prtB</i>	Cette étude
pIJ492	pIJ479 Δ <i>prtD</i>	Cette étude
pIJ521	pGP-Tn7-Gm <i>prtCABD</i>	(Crépin, Harel et al. 2012)
QT3696	QT598 WT	(Marc and Dho-Moulin 1996)

QT4707	QT598 Δ HN-S	Cette étude
QT4430	DH5- α <i>hlyCABD</i>	Cette étude
QT667	BL21	(Jeong, Barbe et al. 2009)
QT4737	BL21 pIJ479	Cette étude
QT5161	BL21 pIJ489	Cette étude
QT5162	BL21 pIJ490	Cette étude
QT5163	BL21 pIJ491	Cette étude
QT5164	BL21 pIJ492	Cette étude
QT4929	CH138 WT	(Johnson, Kariyawasam et al. 2007)
QT4692	CH138 pEC598 Δ <i>iucD</i>	Cette étude
QT5160	CH138 pEC598 Δ <i>iucD</i> Δ <i>prt</i>	Cette étude
QT4845	CH138 pEC598 Δ <i>iucD</i> Δ <i>RU</i>	Cette étude
QT5169	CH138 pEC598 Δ <i>iucD</i> Δ <i>prt</i> att-Tn7- <i>prtCABD</i>	Cette étude
QT5168	CH138 pEC598 Δ <i>iucD</i> Δ <i>RU</i> att-Tn7- <i>prtCABD</i>	Cette étude
QT3707	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT3864	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4039	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4211	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4248	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4378	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4553	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4554	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4558	Souche clinique criblée pour la présence de <i>prtA</i>	Cette étude
QT4663	X7213 DAP ⁻ pIJ521	Cette étude

Tableau III : Liste des amorces utilisées

Amorce	Caractéristiques	Site de restriction	Séquence 5' → 3'
CMD 100	<i>tsh</i> criblage sens	N/A	AGT CAG GGG GAT GCA CAG AAA
CMD 101	<i>tsh</i> criblage anti-sens	N/A	GCG GTT CTC CCA GTC CTC C
CMD 392	<i>rpoD</i> sens qRT-PCR	N/A	GCG TGA AGC GAA AGT TCT GCG TAT
CMD 393	<i>rpoD</i> anti-sens qRT-PCR	N/A	TCG CGG GTA ACG TCG AAC TGT TTA
CMD 1072	<i>glmS_Tn7</i> sens	N/A	CAC CAA TCT TCT ACA CCG T CGC
CMD 1103	<i>tnsC</i> criblage sens	N/A	AAC GCA AAG ATG CGC TGT TAT CGG
CMD 1104	<i>tnsC</i> criblage anti-sens	N/A	AGT TCT GAC ACT ACC GTT TCG CCT
CMD 1152	<i>tus</i> sens qRT-PCR	N/A	CGA TAA CCT TTC GCA AGC AGC GTT
CMD1153	<i>tus</i> anti-sens qRT-PCR	N/A	GGC AAA TGA CGA TGC ACC CAT TCA
CMD 1297	Cassette <i>gentamycine</i> sens	N/A	TAA GAC ATT CAT CGC GCT TG
CMD 1789	<i>prtA</i> criblage sens	N/A	AGG GCA GCA TCA CTC TGA AC
CMD 1790	<i>prtA</i> criblage antisens	N/A	GAA TGT GGT CGT GTC CAT CG
CMD 1804	<i>prt</i> criblage sens	N/A	GCA AAA GAT GCT ATC GCC GTG
CMD 1805	<i>prt</i> criblage anti-sens	N/A	CGT TTC ACT GGC TAC GTT CAG
CMD 1903	Δ <i>prtC</i> sens	SpeI	ACA AGA CTA GTC ACA GAA TTT CAT GCA GGT AAG GTC G
CMD 1904	Δ <i>prtC</i> anti-sens	SpeI	TGA AGA CTA GTA CAT CCC CAA AGC CAG GCG G
CMD 1905	Δ <i>prtA</i> sens	SpeI	GCT TCA CTA GTT CCG AAG TCG ACA AGC CCC AG
CMD 1906	Δ <i>prtA</i> anti-sens	SpeI	CCC AGA CTA GTC GCT GCG AGC GCC AAA TCT TTC
CMD 1907	Δ <i>prtB</i> sens	SpeI	ATC GGA CTA GTA CCG TGA GGA TGG CTG ACC G
CMD 1908	Δ <i>prtB</i> anti-sens	SpeI	ATA CTA CTA CTG CAT GAC CAG CGC AGA AAG TGC
CMD 1909	Δ <i>prtD</i> sens	SpeI	AAT CAA CTA GTT CCC GTA GCC GTT TGG GAG C
CMD 1910	Δ <i>prtD</i> anti-sens	SpeI	AAT CAA CTA GTT CCC GTA GCC GTT TGG GAG C

CMD 1911	<i>ΔprtCABD</i> sens	SpeI	AGGCCTGGCTGCATGTTGAAAAATAAAAC TATTTAAATTTTACGTATATGGTGTAGGCT GGAGCTGCTTC
CMD 1912	<i>ΔprtCABD</i> antisens	SpeI	TTTGTTGGCTACTCCCGACATAGCAAGAA TAACGTTTCAGTCATGCTCTCATGGGAATT ACCATGGTCC
CMD 1941	<i>ΔprtC</i> criblage	N/A	GCG CCT TGC CAT CCT GTC AC
CMD 1942	<i>ΔprtD</i> criblage	N/A	CGA TAC CAT GCA AGT AAC CGT GAC GAG
CMD 2519	<i>prtA</i> sens qRT-PCR	N/A	GAC GCC CAC TTC AGA ATC AC
CMD 2520	<i>prtA</i> anti-sens qRT-PCR	N/A	ATC GGC AAT CGT GCT GGT AT

4.2. Obtention des mutants

Les mutants des gènes individuels de l'opéron *prtCABD* furent obtenus par PCR inverse. À partir du plasmide pUCm-T, des amorces avec des sites de restriction reconnaissant les extrémités du gène qu'il faut enlever servirent pour une amplification PCR en utilisant la polymérase fidèle Q5 (NEB, New England, Biolabs), suivit d'une digestion, ligation et transformation, permettant d'enlever le gène et de garder le reste du système. Un criblage par PCR en observant un changement de taille entre le plasmide encodant les quatre gènes du système et celui ayant une délétion pour un des quatre gènes sert de confirmation de la délétion du gène.

La méthode de (Datsenko and Wanner 2000), basée sur le remplacement du gène, ou des gènes dans ce cas-ci, par une cassette de résistance à un antibiotique, permet la mutation de l'opéron dans la souche sauvage QT598 et la souche APEC CH138. Le plasmide pKD3, codant une cassette de résistance au chloramphénicol, sert de matrice pour l'amplification PCR avec des amorces, dont les extrémités 3' sont homologues aux séquences retrouvées à côté des gènes cibles, et la recombinaison λ Red produite par le plasmide pKD46 permirent de faire la recombinaison homologue. La sélection se fit sur milieu LB avec 30 μ g/ml de chloramphénicol à 37°C afin de perdre le plasmide pKD46 qui est thermosensible.

4.3. Précipitation des protéines au sulfate d'ammonium et migration sur gel

Pour visualiser les protéines du surnageant, 5 millilitres de LB furent inoculés par une culture O/N, puis incubés 3h à 37°C. Cette culture fut ensuite centrifugée 15 minutes à 4000 rpm. Le

surnageant fut récupéré et du sulfate d'ammonium fut ajouté (pourcentage de saturation ammonium = 70) et fut ensuite incubés 1h à 4°C. Les échantillons furent centrifugés à 12000 rpm pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant fut jetée. Le culot fut suspendu dans 100 µL de TE pH 8 et 50 µL de tampon de chargement 3X (bleu de bromophénol 0,02% - xylène cyanol 0,02% - glycérol 3% - tampon TBE), et le tout chauffé pendant 5 minutes dans un bain à 100°C, dernière étape de préparation de l'échantillon pour la migration sur gel de polyacrylamide et coloration au bleu de Coomassie ou Western Blot.

4.4. Western Blot

SDS-PAGE et Western blot ont été réalisés selon les protocoles standard (Kurien and Scofield 2006). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE à 12%, transférées sur des membranes de nitrocellulose, sondées par l'anticorps monoclonal anti-PrtA obtenu à partir de sérum de lapin immunisé à l'aide de PrtA purifiée (NEP, New England, Peptide) (à une dilution de 1 : 3000) et révélée par un anticorps secondaire chèvre anti-lapin conjugué à la peroxydase (1 : 3000) en utilisant le système de détection par chimiluminescence (SuperSignal™, Rockford, USA, ThermoScientific).

4.5. Test d'hémolyse sur gélose sang

Des géloses 5% de sang de moutons, des géloses 5% de sang de poulet, et des géloses 5% de sang de dinde auxquelles on rajouta les antibiotiques appropriés et 10 mM de calcium furent inoculées à partir d'une colonie se trouvant sur gélose LB avec antibiotique à 37°C pendant 18 heures.

Les géloses de sang d'humains furent préparées en ajoutant 5% de sang humain, 10 mM de calcium et les antibiotiques appropriés à du milieu gélosé TSA. Une fois solidifiées, les géloses furent inoculées avec les souches à tester.

4.6. Test d'hémolyse en liquide

Les différents types de sang d'animaux et d'humains utilisés pour ces tests proviennent de l'INRS-IAF ou des fournisseurs (Hemostat Lab). La solution de sang d'abord dut être ajustée à 1% en érythrocytes afin de pouvoir calculer le pourcentage d'hémolyse selon (Harshman, Sugg et al. 1988). Cette étape consista à ajouter 0.5 mL de sang à 3.5 mL d'eau, suivit d'une centrifugation et de la lecture de la densité optique du surnageant à 545 nm. La valeur obtenue doit se situer à

0.30 ± 0.02 car celle-ci simule une lyse de 50% des érythrocytes présents et permet de calculer le pourcentage en érythrocytes des échantillons de sang. Si la densité optique ne se situe pas dans cette zone, il est nécessaire d'ajuster en conséquence.

Il faut ensuite ajuster la quantité de bactéries de cultures à DO₆₀₀ de 0.8 afin d'avoir une concentration de 2x10⁷ bactéries/mL. Cent µL de la solution sanguine de 2% qui a été ajusté par ajout de saline + 10 mM de Ca²⁺ furent ajoutés à 100 µL de la solution bactérienne afin d'obtenir une solution sanguine finale de 1%, et le tout incubé dans à 37°C pendant 4 heures. Le surnageant fut récolté après une centrifugation de 5 minutes à 500 x g et sa densité optique mesurée à 545 nm. Ce protocole fut modifié de celui déjà publié (Harshman, Sugg et al. 1988).

4.7. Extraction d'ARN et qRT-PCR

4.7.1. Extraction de l'ARN

Les échantillons de poumon, de rate et de foie ont été placés dans 1 ml de Trizol (Invitrogen) dans un tube à bouchon vissé de 2 mL. Les tissus ont été lysés grâce au Tissue Tearor pendant 1 à 2 minutes à la vitesse 20. Après centrifugation pendant 5 minutes à 3 500 rpm, la phase aqueuse a été recueillie et traitée pour l'extraction de l'ARN grâce au kit Direct-zol™ RNA Miniprep (Zymo Research, USA). L'ARN de la phase aqueuse a été précipité avec 1 mL d'éthanol (95-100%). Les échantillons ont ensuite été traités par la DNase I puis incubés 15 min à 37°C. L'ARN a enfin été remis en suspension dans 40µL d'eau sans DNase/RNase.

L'ARN a également été extrait de bactéries cultivées en phase stationnaire (culture de 18 h) dans du LB à 37 ° C avec agitation. Un total de 500 µL de culture a été transféré dans un tube eppendorf (Frogga Bio) contenant du RNA Protect (Qiagen). Les bactéries ont été culotées par centrifugation 10 min à 5000 g. Les parois bactériennes ont été détruites par ajout de TE lyzosome à 0,4 mg/mL et les bactéries ont été lysées par addition d'un tampon de lyse. Les lysats bactériens ont ensuite été placés dans des EZ-10 Spin Column, puis lavés à l'aide d'une Solution RPE (QIAGEN). Pour chaque échantillon, l'ADN contaminant a été éliminé en utilisant des colonnes RNeasy (QIAGEN) et un traitement sur colonne DNaseI (QIAGEN). L'ARN a finalement été élué dans 50 µl d'eau exempte de nucléase et quantifié à l'aide d'un Spectrophotomètre NanoDrop ND-1000.

4.7.2. Synthèse de l'ADNc

L'ARN a été converti en ADNc en utilisant la transcriptase inverse Superscript RT III (Invitrogen) et un mélange d'amorces spécifiques des gènes *rpoD*, *tus* et *prt* (2 pmoles de chaque amorce par 20 µL de réaction). La réaction de transcription inverse a été préparée en utilisant 2 µL d'ARN (100 ng pour l'ARN de bactéries cultivées in vitro) et incubée 5 minutes à 65°C, puis un volume réactionnel de 20 µl a été préparé selon les instructions du fabricant. La préparation a ensuite été incubée 15 minutes à 42°C puis 5 s à 85°C. Trois réactions de RT indépendantes ont été réalisées pour chaque échantillon.

4.7.3. PCR quantitative

La PCR quantitative a été réalisée à l'aide d'un thermocycleur qPCR Rotor-Gene 3000 (Corbett Research) et de mélanges de Tip Green qPCR Supermix (TransStart) dans un volume réactionnel de 20 µl. Deux microlitres d'ADNc ont été utilisés dans chaque réaction. Les amorces utilisées sont données dans le tableau 2. Les paramètres de cyclage étaient les suivants : 30 s à 94 ° C suivis de 40 cycles de 5 s à 95 ° C et 30 s à 60 ° C. Des réactions qPCR de témoin négatif ont été réalisées en utilisant de l'eau.

4.8. Infection de modèle aviaire

Le protocole animal utilisé fut approuvé par le comité éthique de l'INRS-IAF et se base sur le protocole animal décrit par (Caza, Lépine et al. 2008). L'infection des poussins de 3 semaines fut effectuée en utilisant les souches CH138 sauvage, CH138 pEC598 ; CH138 pEC598 Δprt ; CH138 pEC598 $\Delta prt prt^+$; CH138 pEC598 ΔRU ; CH138 pEC598 $\Delta RU prt^+$. Une première préculture O/N de 5 ml de LB avec antibiotiques à 37°C a été inoculée à partir d'une colonie sur gélose fraîche. Ensuite, une seconde préculture de LB avec antibiotiques a été inoculée pendant 6h à 37°C. Un volume de 100 µL de la deuxième préculture fut ajouté à 10 mL de BHI, puis congelé à -80°C. Un échantillon fut prélevé et des dilutions furent étalées sur gélose MacConkey afin d'effectuer un décompte bactérien pour s'assurer de la concentration bactérienne pour ajuster la concentration de l'inoculum.

Les poussins reçurent l'inoculum de 100 µL, l'équivalent de 2×10^7 à 5×10^7 bactéries, directement dans le sac aérien gauche. L'infection dura 48 heures. Les poussins furent euthanasiés par CO₂, le sang fut récupéré à 6, 24 et 48h et le poumon, la rate et le foie furent récupérés et broyés dans un tampon de BSG (1.5 M de NaCl, 20 mM de KH₂PO₄, 50 mM de Na₂HPO₄ et 0.1% de gélatine)

d'un volume équivalent à 2 fois la masse de l'organe, de dilution et d'étalement sur gélose MacConkey. Les géloses furent incubées à 37°C pour la nuit afin d'effectuer un décompte bactérien le lendemain. Un test t de Mann-Whitney servit de tests statistiques pour l'analyse des résultats des infections chez les poussins (test statistique effectué à partir du logiciel GraphPad Prism version 7.0 pour Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com).

5. Article

Les co-auteurs Amélie Garénaux, Ségolène Maris, Charlène Herscher et Noémie Fessy ont participées lors de la découverte et du criblage du système, et de la détermination de l'abondance du gène *prtA* chez des isolats cliniques d'*E. coli* et de la détermination de l'organisation en opéron de *prtCABD*.

Les co-auteurs Hicham Bessaiah, Hajer Habouria et Privil Pokharel ont aidés dans la réalisation des infections de poussins mais pas de la traite des données.

Le co-auteur Joseph Saoud a réalisé l'expérience sur l'effet cytopathique de PrtA sur les cellules de fibroblastes aviaire et de macrophages humains (avec l'aide de Sébastien Houle).

Toutes les autres expériences ainsi que la totalité de l'écriture de cet article ont été réalisées par mes soins ainsi qu'avec l'aide de Sébastien Houle, l'assistant de recherche du laboratoire et mon directeur le Professeur Charles M. Dozois, qui m'ont accompagné tout au long de ma Maîtrise et des expériences.

Title : The Pre-repeats containing toxin (Prt), is a novel RTX toxin contributing to virulence of Avian Pathogenic *E. coli*

Key words : *Escherichia coli*, RTX, Prt, toxin, avian pathogenic *Escherichia coli*, poultry

Authors : Rémi Dagès^{1,2}, Hicham Bessaiah^{1,2}, Joseph Saoud^{1,2}, Hajer Habouria^{1,2}, Pravil Pokharel^{1,2}, Amélie Garénaux^{1,2}, Ségolène Maris^{1,2}, Charlène Herscher^{1,2}, Noémie Fessy^{1,2}, Sébastien Houle^{1,2}, Charles M. Dozois^{1,2,3*}

1 Institut national de recherche scientifique (INRS) - Centre Armand Frappier Santé Biotechnologie

2 Centre de recherche en infectiologie porcine et avicole (CRIPA)

3 Institut Pasteur International Network

*** Corresponding author:**

Charles M. Dozois

INRS-Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

531 boul des Prairies

Laval, Quebec

CANADA, H7V 1B7

E-mail : charles.dozois@iaf.inrs.ca

1 **ABSTRACT :**

2 *Escherichia coli* is a commensal bacterium and member of the normal microbiota in humans and
3 other animals. However, some strains are pathogenic and produce virulence factors that
4 contribute to enteric or extra-intestinal infections. A novel genetic region on a Colicin V (CoIV)
5 plasmid containing genes predicted to encode a new RTX toxin was identified in an extra-intestinal
6 pathogenic *E. coli* O1:K1 strain (QT598). The system was named Prt (**P**re-repeats containing **R**TX
7 **t**oxin). These toxins are pore-forming and often demonstrating hemolytic activity. Although QT598
8 is not hemolytic on blood agar plates, when expressed on a plasmid, Prt showed hemolytic activity
9 on erythrocytes from different species and cytolytic effects on avian fibroblasts and human
10 macrophage, bladder and kidney cells. The *prt* genes were present in 2% of APEC and 0.9% of
11 UPEC strains tested. This new RTX toxin is distinct from the known RTX systems in *E. coli*. Also,
12 Prt protein sequence did not show any strong similarity with the know RTX systems in *E. coli* but
13 was rather closer of RTX systems from the *Pasteurellaceae* family. The role of the Prt toxin for
14 virulence of ExPEC strains was also tested in a chicken infection model. This was done by
15 comparing virulence of APEC O1:K1 strain CH138 containing the CoIV plasmid from strain QT598
16 with or without deletion of the *prtCABD* genes. Loss of *prtCABD* showed higher survival rates
17 during the 48h of the infection whereas presence of *prtCABD* demonstrated 50% of lethality in
18 chicks. Loss of *prtCABD* significantly reduced colonization in the lungs, spleens and liver as well
19 as in the blood 24- and 48-hours post-inoculation. Further, during chicken infection, the *prtA* gene-
20 expression was upregulated a mean of 500-fold in the air sacs compared to growth *in vitro*. Taken
21 together, these results indicate that the Prt is a novel member of the RTX-family that is induced *in*
22 *vivo* and that can contribute to the extra-intestinal virulence of *E. coli*.

23 **INTRODUCTION :**

24 *Escherichia coli* is one of the best-characterized model organisms, and can be both a commensal
25 bacterium and a versatile pathogen associated with intestinal and extra-intestinal infections
26 (Croxen and Finlay 2010). Pathogenic *E. coli* can be divided into two groups, intestinal pathogenic
27 *E. coli* causing intestinal infections and extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) that can infect
28 multiple organs (Kaper, Nataro et al. 2004). Among ExPEC, strains are classified by pathotypes
29 based on the cellular tropism, the infected host and the mode of infection and are divided into four
30 main groups, neonatal meningitis associated *E. coli* (NMEC), sepsis-associated *E. coli* (SEPEC),
31 uropathogenic *E. coli* (UPEC) and avian pathogenic *E. coli* (APEC) (Johnson and Russo 2002,
32 Kaper, Nataro et al. 2004, Clermont, Olier et al. 2011). APEC cause serious respiratory and
33 systemic diseases in chickens, commonly known as colibacillosis. Avian colibacillosis causes

34 important economic losses due to decreased hatching rates or egg production, mortality in poultry
35 flocks and is also very expensive in treatment costs (Guabiraba and Schouler 2015).

36

37 The genomes of several APEC strains and their virulence plasmids have been sequenced and
38 share similarities to some human ExPEC isolates and their plasmids (Johnson 1991, Johnson and
39 Nolan 2009, Dziva, Hauser et al. 2013, Dale and Woodford 2015). Because of the rapid evolution,
40 on a broader scale, EXPEC strains are constantly evolving. The plasticity of the bacterial genome
41 has allowed *E. coli* to exchange, gain or lose different genetic material, and has led to transfer of
42 a diversity of genes that encode virulence or fitness properties on mobile genetic elements, such
43 as plasmids, transposons, bacteriophages or pathogenicity islands (Bergthorsson and Ochman
44 1998). APEC and UPEC strains share some virulence factors that help overcome host defenses
45 and promote colonization or invasion of the urinary tract or systemic infection of poultry (Johnson
46 1991). These include iron acquisition systems, autotransporter (AT) proteins, fimbriae, O- and K-
47 antigens, secretion systems and toxins (Dho-Moulin and Fairbrother 1999, Johnson and Russo
48 2002, Kaper, Nataro et al. 2004, Dziva and Stevens 2008, Croxen and Finlay 2010). Most APEC
49 strains contain conjugative colicin V (ColV) or similar plasmids that encode multiple virulence
50 genes that contribute to virulence in poultry (Dozois, Dho-Moulin et al. 2000, Dozois, Daigle et
51 al. 2003, Mellata, Dho-Moulin et al. 2003) and to urinary tract infection or systemic infection in
52 murine models (Johnson, Johnson et al. 2006, Ewers, Li et al. 2007, Terlizzi, Gribaudo et al. 2017,
53 Habouria, Pokharel et al. 2019). We have identified a distinct region from ColV plasmid in an
54 APEC O1:K1 strain, QT598, which contains 3 distinct putative virulence factors: a fimbrial system,
55 a serine protease autotransporter and a novel RTX toxin. This unique region on the ColV plasmid
56 contributes to virulence and lethality of chicks and as such we have named it the **Enhanced**
57 **Virulence Island (EVI)**. The serine protease autotransporter, Sha (**S**erine protease **h**emagglutinin
58 autotransporter) has been recently characterized for its potential role in a urinary tract infection
59 model (Habouria, Pokharel et al. 2019).

60

61 Among pathogenic *E. coli* virulence factors, RTX (repeats in toxin) toxins are members of
62 a family of proteins synthesized by a range of Gram-negative pathogenic bacteria, and have two
63 common features : the presence of rich glycine- and aspartate-rich repeats and secretion via a
64 type 1 secretion system (SST1) (ATP-Binding Cassette transporter (ABC)) (Welch 2001).
65 Members of the RTX family include cytolytic toxins, metalloproteases, and lipases (Frey and
66 Kuhnert 2002). These toxins all have a common gene organization and distinct structural features.
67 Although variations exist, the generic operon of the RTX toxin consists of four genes that are

68 designated *rtxC*, *A*, *B*, and *D* in the order of transcription (Stanley, Packman et al. 1994,
69 Linhartová, Bumba et al. 2010). The *rtxA* gene encodes the toxin protein precursor, RtxC is an
70 acetyl transferase, and RtxB and D comprise the export system for secretion of the toxin (Stanley,
71 Packman et al. 1994). RTX toxins require post-translational modification by their acetyl transferase
72 to become biologically active (Welch 2001, Linhartová, Bumba et al. 2010, Wiles and Mulvey
73 2013). RTX toxins present in ExPEC and other bacteria including members of the
74 *Pasteurellaceae*, *Pseudomonas*, *Erwinia*, *Serratia* (Coote 1992, Linhartová, Bumba et al. 2010).

75

76 Among pathogenic *E. coli* the two well-known cytolytic RTX-toxins are Hly and Ehx toxins
77 found in ExPEC and some Shiga-toxinogenic/Enterohemorrhagic *E. coli* respectively (Bauer and
78 Welch 1996, Wiles and Mulvey 2013). However, the presence of any such hemolysins or RTX
79 toxins is uncommon among APEC. The EVI region of the APEC CoIV plasmid pEC598 contains
80 a new RTX system which we have named Prt for Pre-repeats containing RTX toxin : *prtCABD* of
81 the RTX family that have not been characterized yet (Prt for **P**re-repeats containing **R**TX toxin)
82 (Habouria, Pokharel et al. 2019).

83

84 Herein, we have characterized the Prt toxin, determined its prevalence among avian and human
85 urinary tract isolates, and among bacterial genome sequence databases and have determined its
86 hemolytic and cytotoxic activity and investigated the role of this toxin for virulence and colonization
87 of the chicken in a respiratory tract infection model.

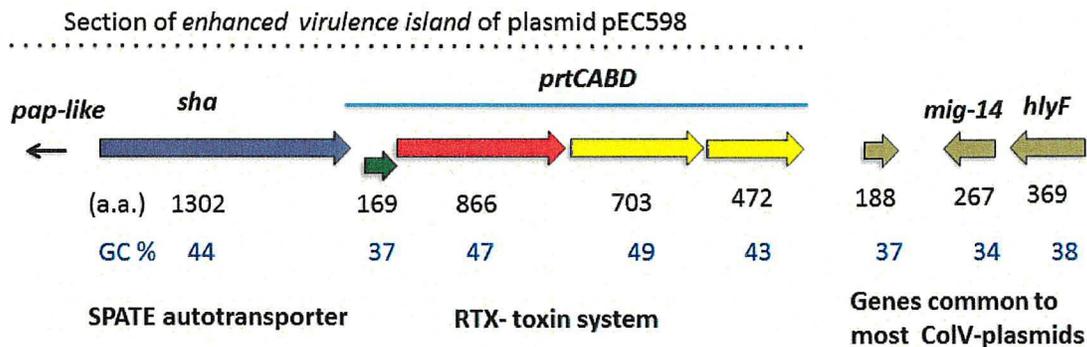
88

89 **RESULTS :**

90 **Genetic relatedness of PrtA with others RTX toxins**

91 Strain QT598 (Habouria, Pokharel et al. 2019) was initially isolated from an infected turkey poult
92 in France as MT156 (Marc and Dho-Moulin 1996). This strain is a phylogenetic group B2 strain
93 belonging to serogroup O1 and is known to cause infections in both poultry and some other strains
94 are known to be able to infect humans as well. The genome of this APEC strain was sequenced
95 initially because it contains most of the known APEC-associated virulence genes and was
96 previously found to be lethal in one day-old chickens (Dozois, Fairbrother et al. 1992). QT598
97 belongs to sequence type (ST) 1385. Other strains belonging to ST1385 include other APEC O1
98 isolates, a canine urinary isolate, and environmental isolates (<http://enterobase.warwick.ac.uk/>)
99 (Habouria, Pokharel et al. 2019). Although strain QT598 did not demonstrate any hemolysis zones
100 around colonies when grown on blood agar plates the genome of this strain contains a new RTX

101 encoding sequence. This operon is located on a ColV-type plasmid (pEC598) and contains 4
 102 genes: *prtCABD* (for pre-repeat containing RTX toxin) (Fig.13). This predicted RTX encoding
 103 system has an organization similar to other RTX toxin but is distinct from currently characterized
 104 RTX members.



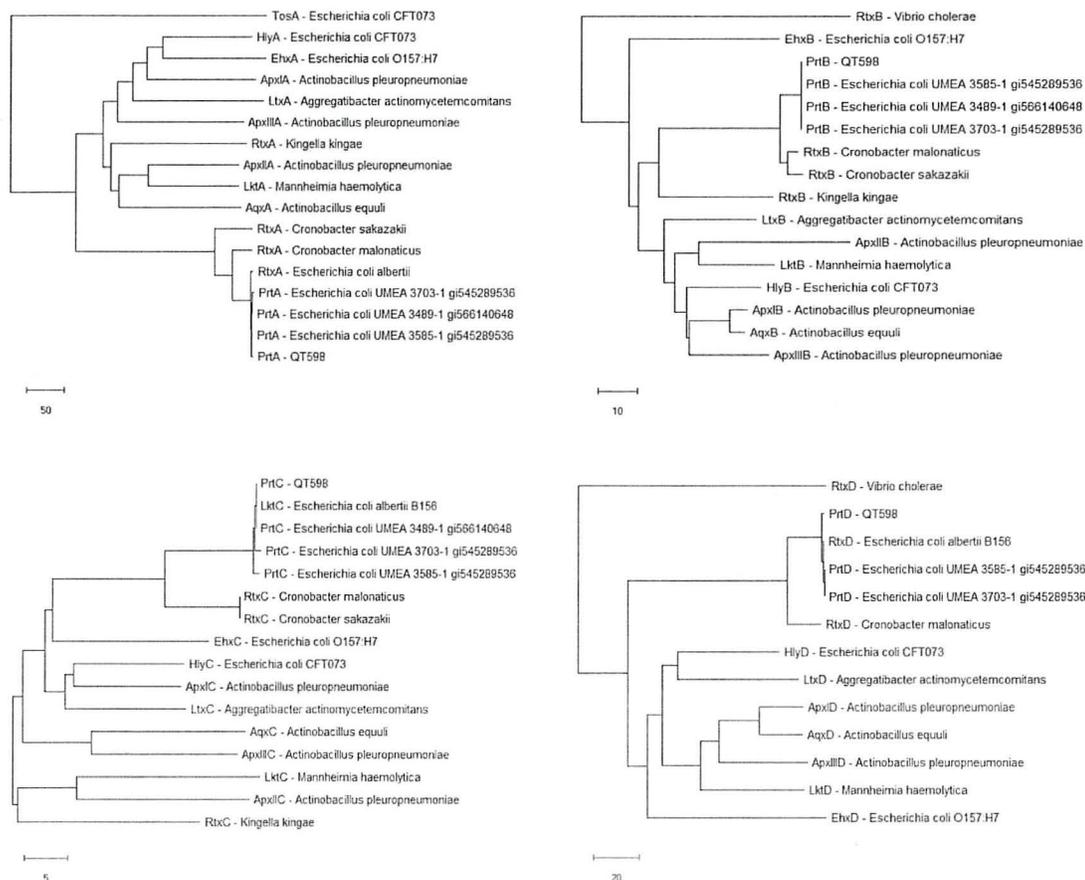
105

106 *Figure 13 : Region containing the Pre-repeats in toxin (Prt) genes within the enhanced virulence island of ColV-type*
 107 *plasmid pEC598.*

108 *Arrows indicate open reading frames (ORFs). The prt system comprises prtC (green) encoding the acetyl transferase,*
 109 *prtA (red) encoding the PrtA toxin, and prtBD genes (yellow) encoding the Type 1 ABC-transporter secretion system. A*
 110 *pap-like fimbrial operon (not shown) and the sha autotransporter gene (purple) is encoded upstream of the prt genes.*
 111 *Genes downstream of prt (beige) are common to most other ColV-plasmids, although the ORFs encoded on pEC598*
 112 *are allelic variants or similar proteins from reference ColV plasmids.*

113

114 We first determined the amino acid identity of the predicted proteins encoded by the *prtCABD*
 115 genes with those of other RTX proteins identified by BLASTp comparisons. The nucleotide
 116 sequence of the genes was translated into protein sequence to identify similar proteins in order to
 117 identify the origin of the system and/or its distribution in other *E. coli* strains (Fig. 14).



118

119 *Figure 14 : Phylogenetic tree demonstrating relatedness among RTX toxins for the 4 protein sequences of the operon*
 120 *prtCABD.*

121 *The evolutionary history of RTX genes were inferred using the Neighbor-Joining method and the phylogram was derived*
 122 *with the MEGA software package (Tamura, Stecher et al. 2013) with ClustalW alignments of the predicted amino acid*
 123 *sequences of several RTX A, B, C and D proteins (Saitou and Nei 1987). Toxin sequences : Ltx, leukotoxin of A.*
 124 *actinomycetemcomitans [WP_053330071] (Kolodrubetz, Dailey et al. 1989); ApxI and ApxII, hemolysins of A.*
 125 *pleuropneumoniae [AAL55666 and AAU84700 respectively] (Chang, Young et al. 1991, Frey, Meier et al. 1991); Hly,*
 126 *hemolysin of E. coli CFT073 [AAN82018] (Felmlee, Pellett et al. 1985); ApxIII, leukotoxin of A. pleuropneumoniae*
 127 *[CAA48711] (MacDonald and Rycroft 1992); Lkt, leukotoxin of M. haemolytica [AAL13281] (Lo, Strathdee et al. 1987,*
 128 *Highlander, CHIDAMBARAM et al. 1989); Ehx, cytotoxin of E. coli O157:H7 [WP_140405433] (Bauer and Welch 1996);*
 129 *Aqx, cytotoxin of A. equuli [AAM45569] (Berthoud, Frey et al. 2002) (Accession number given are for the RtxA peptide).*

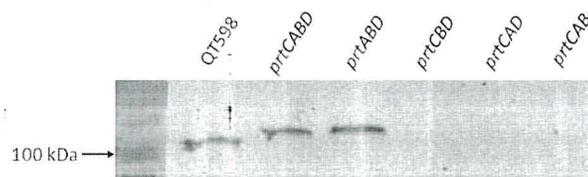
130

131 The *prt* genes from pEC598 share highest identity to near identical systems from the recently
 132 sequenced genomes of other clinical UPEC strains suggesting that this system can be found in
 133 both APEC and UPEC strains. The percent identity of the 4 protein sequences of the Prt operon
 134 with other members of the family indicates that the protein shares more identity with proteins of
 135 RTX systems of other species than with systems already characterized in pathogenic *E. coli*, the
 136 Hly and Ehx toxins (only 36.4% and 36.6% identity of PrtA protein sequence respectively). Indeed,

137 the PrtA protein sequence is most similar to uncharacterized Rtx sequence (RtxA) present in some
138 *Cronobacter* strains (*Cronobacter malonaticus* with 91.5% (WP_032970761.1) and *Cronobacter*
139 *sakazakii* with 85.2% (WP_085044946.1)) and shares highest identity to characterized systems
140 from the *Pasteurellaceae* (41.4% identity to LktA from *Mannheimia haemolytica*, 42.1% identity to
141 ApxIIA from *Actinobacillus pleuropneumoniae*). The prevalence of prt sequence was investigated
142 by PCR in a collection of UPEC isolates from Guadeloupe (697 isolates) (Guyomard-Rabenirina,
143 Malespine et al. 2016) and from avian pathogenic *E. coli* (306 isolates) (Dozois, Dho-Moulin et al.
144 2000, Houria, Pokharel et al. 2019). Among the APEC isolates, 6 of them (1.96%) contained *prt*
145 genes, and among the UPEC isolates, 6 of them (0.86%) were also positive for *prt* genes. The 6
146 UPEC isolates containing *prtCABD* sequence belonged to the B2 phylogenetic group. The *prt*
147 gene cluster has a G-C content of 45% which is somewhat less than the *E. coli* genomic average
148 of is about 52% (Muto and Osawa 1987). By contrast, the G-C content of the *Pasteurellaceae*
149 family varies from 37%-45% (Kuhnert and Christensen 2008). As has been suggested for other
150 RTX toxin in *E. coli* (Cheetham and Katz 1995), this suggest that the *prt* genes may have been
151 acquired through horizontal transfer from a lower G-C content species such as a member of the
152 *Pasteurellaceae*.

153 **The *prt* genes encode a functional RTX toxin**

154 The *prtCABD* genes and predicted promoter's region were cloned on a multicopy plasmid to
155 determine their expression and biological activity. When all four genes were cloned into *E.*
156 *coli* BL21 a high-molecular-weight protein (90 kDa) was present in culture supernatants that
157 corresponded to the expected product of the PrtA toxin polypeptide (Fig. 15).



158

159 *Figure 15 : Detection of PrtA in culture supernatant fluids by western blotting.*

160 *Clones expressing RTX proteins were produced in the BL21 background with high-copy plasmid pBCsk+. A 10 µL*
161 *aliquot of culture supernatant fluids from QT598, BL21 pIJ479 and all the mutants with protein marker (10 – 200 kDa)*
162 *were loaded in each lane. Supernatants from an overnight culture were separated on a sodium dodecyl sulfate–12%*
163 *polyacrylamide gel, and RTX toxin was detected by Western blotting with polyclonal anti-PrtA antibody and Goat anti-*
164 *rabbit serum as second antibody. Arrows on the left denote the ladder.*

165

166 Further, culture supernatant fractions from wild-type strain QT598, as well as clone encoding only
167 the *prtABD* genes, but lacking the *prtC* gene, encoding the predicted acetyltransferase, also

168 contained a PrtA protein, as determined by Western blot. By contrast, the PrtA product was not
169 detected from supernatant extracts of clones lacking either the *prtA*, *prtB*, or *prtD* genes (Fig. 15).
170 These strains were also plated on sheep, chicken and human blood agar plates and showed the
171 need for the toxin PrtA and acetyltransferase PrtC for activity, and a lack of hemolytic activity when
172 there was no secretion (absence of *prtB* and *prtD*). TolC was also showed to be necessary for
173 hemolytic activity of PrtA toxin (Fig. 17). These results are in line with other members of the RTX
174 toxin family, wherein the *prtB* and *prtD* genes are needed for secretion of the RTX toxin. Those
175 results show that like others RTX toxin, our new system needs its *prtB* and *prtD* genes to be
176 produced in culture supernatants, as they act as transport system. The Δ *prtC* mutant produced a
177 band around the desired molecular weight (Fig. 15), meaning that the PrtA toxin is produced in
178 culture supernatant but is not effective as discovered in haemolysis assays.

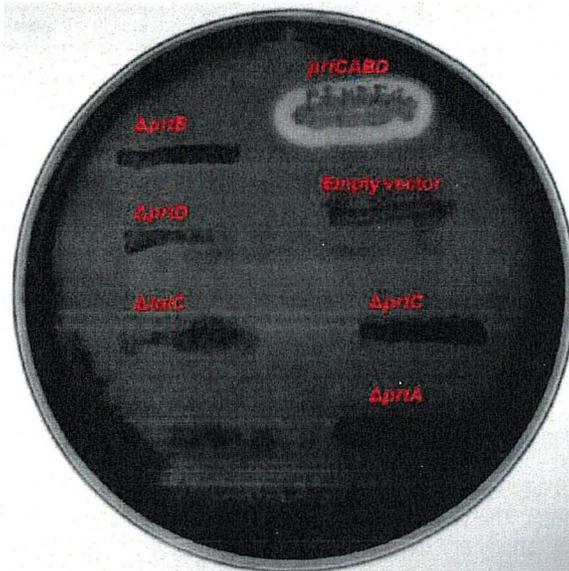
179 **Relationship of Prt toxin system and pre-repeat sequences in PrtA**

180 It is known among RTX leukotoxins that the calcium-binding domain (residues 723-872), is
181 composed of several consecutive repeats of a nonapeptide consensus sequence :
182 GGXGXDX[L/I/V/W/Y/F]X (where [L/I/V/W/Y/F] are bulky, nonpolar, hydrophobic residues and X
183 can be any amino acid) (Wang, Kieba et al. 1998, Cortajarena, Gofii et al. 2003). Interestingly,
184 analysis of the PrtA sequence identified the presence of a consensus repeat region with 8
185 consecutive nonapeptides, as well as the presence of 2 nonapeptides 75 amino acids before the
186 actual nonapeptide repeats region (Fig. 16). We verified the presence or absence of these repeat
187 sequences in other members of the RTX family, and determined that the other RTX members
188 more closely related to PrtA also had nonapeptide pre-repeats in their sequences: RtxA from
189 *Kingella kingae*, ApxIIA from *Actinobacillus pleuropneumoniae*, LktA from *Mannheimia*
190 *haemolytica*, AqxA from *Actinobacillus equuli*, RtxA from *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter*
191 *malonaticus*. Based on these findings, we propose that there are distinct subgroups of RTX toxins,
192 with one class containing pre-repeats, and others only containing a specific consensus repeat
193 region, that is a standard feature of RTX toxins.

198 Toxin sequences : *Ap_{xll}*, hemolysins of *A. pleuropneumoniae* [AAL55666 and AAU84700 respectively] (Chang, Young
199 *et al.* 1991, Frey, Meier *et al.* 1991); *Hly*, hemolysin of *E. coli* CFT073 [AAN82018] (Felmlee, Pellett *et al.* 1985); *Lkt*,
200 leukotoxin of *M. haemolytica* [AAL13281] (Lo, Strathdee *et al.* 1987, Highlander, CHIDAMBARAM *et al.* 1989); *Ehx*,
201 cytotoxin of *E. coli* O157:H7 [WP_140405433] (Bauer and Welch 1996); *Aqx*, cytotoxin of *A. equuli* [AAM45569]
202 (Berthoud, Frey *et al.* 2002) (Accession number given are for the *RtxA* peptide)

203 Hemolytic activity of bacteria expressing Prt toxin

204 Although colonies of strain QT598 did not demonstrate hemolytic activity on sheep blood agar,
205 production of Prt toxin was nevertheless detected from QT598 culture supernatant by Western
206 blot (Fig. 17).



207

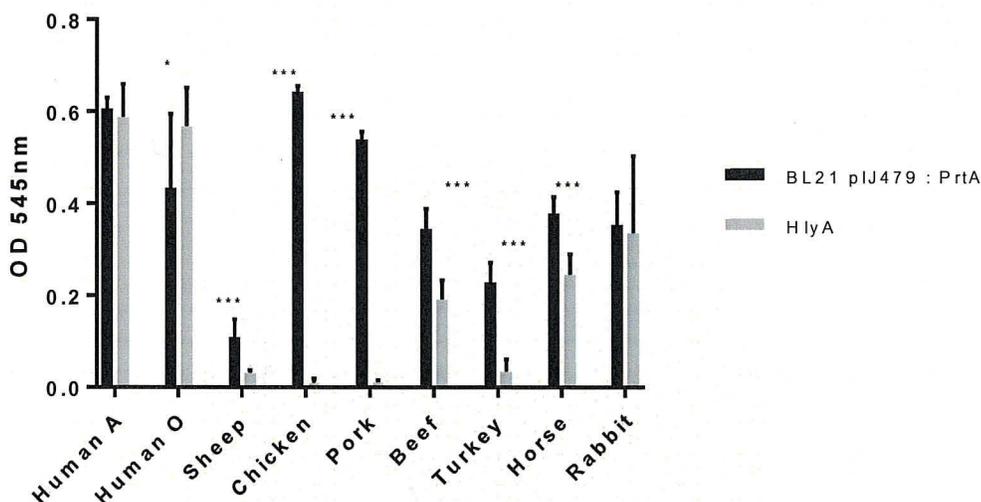
208 *Figure 17 : Growth of E. coli on sheep agar plate supplemented with CaCl₂ (10mM).*

209 *Clones expressing RTX proteins were produced in the E. coli K12 strain BL21 background with high-copy plasmid*
210 *pBCsk+. Plates were incubated 24h at 37°C. Only the strain possessing the whole prtCABD operon was showing*
211 *significant hemolysis on sheep agar plates.*

212

213 This suggested Prt may demonstrate differences in activity against erythrocytes from different
214 sources. To investigate this, hemolytic activity of Prt was assessed on erythrocytes from different
215 animal species in a liquid assay of interaction of erythrocytes with *E. coli* expressing the Prt
216 system. Hemolysis of different types of erythrocytes by PrtA was determined by
217 spectrophotometry and compared to the activity of hemolysin A (HlyA) (positive control) (Fig. 18).
218 The hemolytic activity of HlyA is broad (Goebel and Hedgpeth 1982) and our results show that
219 bacteria expressing HlyA demonstrated strong hemolytic activity for human blood and less marked
220 activity for beef, horse and rabbit blood (Fig. 18). Hemolytic activity of bacteria expressing PrtA
221 was found to be similar to HlyA against human and rabbit erythrocytes. Hemolytic activity of PrtA

222 on sheep, beef and horse blood was also less marked, although it was greater than HlyA-mediated
 223 hemolysis. In addition, PrtA also demonstrated strong hemolytic activity on chicken, turkey and
 224 pig blood, whereas HlyA only showed low or negligible hemolytic activity for chicken, turkey and
 225 pig erythrocytes.



226

227 *Figure 18 : Hemolytic activity of the prtA gene from a multicopy plasmid and the known hlyA gene.*

228 *The hemolytic assay was performed with bacteria supernatant and several types of blood incubated for 4 h at 37°C as*
 229 *described in Materials and methods. The values obtained for the empty vector were subtracted from the values obtained*
 230 *for PrtA and HlyA. Statistical differences are noted : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, Mann-Whitney Test.*

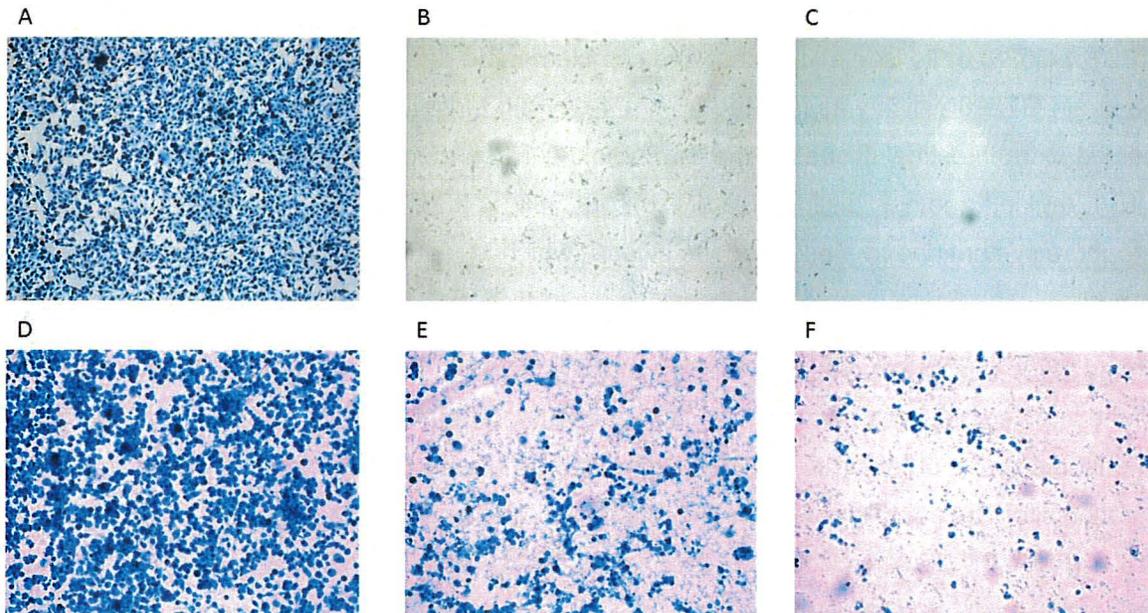
231

232 These experiments indicate that PrtA demonstrates hemolytic activity against erythrocytes from a
 233 variety of species. In fact, PrtA even demonstrated a greater range of activity than HlyA on
 234 erythrocytes from some species such as poultry and swine. Thus, as with HlyA (Linhartová,
 235 Bumba et al. 2010), PrtA could be considered a broad range hemolysin. Importantly however, PrtA
 236 mediated hemolytic activity in this assay was only observed when the toxin was expressed from
 237 a a multi-copy plasmid. In this respect, in all likelihood, PrtA as with HlyA may also more
 238 specifically target other host cells *in vivo* during the infection process.

239 **Cytopathic effect of the Prt toxin on different kinds of host cells.**

240 Since RTX toxins have cytopathic activity on host cells (Chatterjee, Nag et al. 2008, Habouria,
 241 Pokharel et al. 2019), we assessed the cytopathic effect of *E. coli* expressing either *prtCABD* or
 242 *hlyCABD* from a multi-copy plasmid, on CEC-32 avian fibroblasts, THP-1 human macrophages,
 243 human bladder and kidney (HEK 293) cells. Bacteria expressing either *prtCABD* and *hlyCABD*

244 were incubated with different host target cell types to allow association of bacteria to the host cells
 245 during production and release of these toxins in the culture medium (Table 6). Avian fibroblasts,
 246 human macrophages, human urothelial cells and human kidney cells lysis were complete after 3
 247 h by the HlyA positive control, but PrtA lyses these cells very well as well (Fig. 19 and Table IV).
 248 Negatives controls BL21 empty plasmid showed no cytopathic effects on any of the host cells
 249 tested.



250
 251

252 *Figure 19 : The cytopathic effects of PrtA from strain QT598 on CEC-32 avian fibroblasts and human macrophages in*
 253 *culture.*

254 *PrtCABD internalized in CEC-32 fibroblasts. CEC-32 cells were infected with our toxin PrtA and HlyA. After 3 h of*
 255 *incubation, cells were fixed in formaldehyde; (A) CEC-32 with empty vector, (B) CEC-32 with E. coli QT598 prtCABD,*
 256 *(C) CEC-32 with E. coli hlyCABD, (D) THP1 with empty vector, (E) THP1 with E. coli QT598 prtCABD, (F) THP1 with*
 257 *E. coli hlyCABD.*

258

259 *Table IV : The cytopathic effects of PrtA from strain QT598 on different kind of cells*

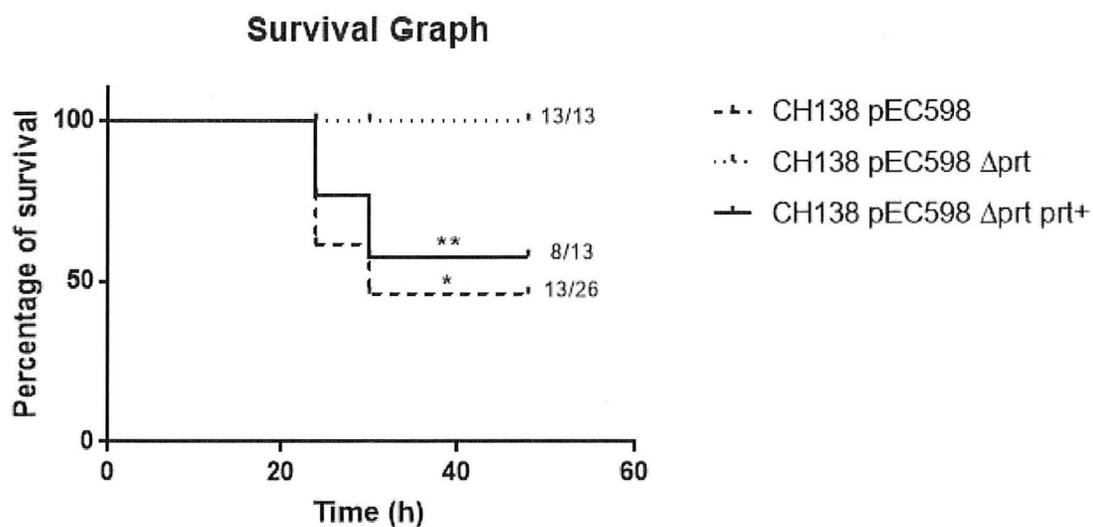
Toxin	Host cells			
	Avian Fibroblasts	Human macrophages	Human urothelial cells	Human kidney cells
prtCABD	+++	+	++	+++
hlyCABD	+++	+++	+++	+++
Empty vector	-	-	-	-

260

261 **The Prt toxin plays an important role for virulence of avian pathogenic *E. coli***

262 To characterize the importance of the *prtCABD* genes in APEC virulence, we designed a
263 comparative infection experiment using a virulent APEC O1:K1 strain CH138, which contains a
264 more typical ColV plasmid (pEC138), as a virulent reference strain. We then generated a
265 derivative of CH138 wherein pEC138 was replaced by the larger pEC598 which carries the EVI
266 region encoding the Prt system, and also generated a variant of this strain with a deletion of the
267 *prt* genes. Groups of 3-week-old birds were inoculated in the left caudal thoracic air sac with
268 CH138 (pEC598) or its isogenic mutant and complemented derivatives. This approach was used
269 since strain QT598 which was isolated from a 4-day-old turkey, was of low virulence and poorly
270 colonized extra-intestinal tissues in the 3-week-old-chicken model. In addition to the presence of
271 the EVI region, another distinct feature of pEC598 is the lack of a functional aerobactin
272 siderophore system due to a pseudogene in *iucC*, which is required for aerobactin synthesis.

273 Following infection, 10/26 (38%) of the chickens that received CH138 (pEC598) died within
274 24 h and 13/26 (50%) had died by 48 h (Fig. 20). By contrast, in the CH138 (pEC598 Δ *prt*) strain,
275 all of the infected chickens survived. To confirm the important role of the Prt toxin for virulence in
276 chickens, the Δ *prt* mutant strain was complemented by introduction of the *prt* genes at the *attTn7*
277 integration site. The complemented strain, regained virulence and 6/13 (46%) of the chickens died
278 by 48 h (Fig. 20). Bacterial counts in blood and tissues also indicated a role for Prt in extra-
279 intestinal infection. In blood, the Δ *prt* mutant strain demonstrated lower counts than CH138
280 (pEC598) or the complemented strain at 6h, 24h, and 48 h (endpoint of the experiment) (Fig. 21),
281 although counts of the complemented strain in the blood were also reduced at 48h (Fig. 21C).
282 The lower counts for the complemented strain could be explained by the fact that half of the
283 infected chickens were dead by 48 post-inoculation and surviving chickens that had overcome a
284 systemic infection are expected to have reduced levels of bacteremia. Bacterial counts in the liver,
285 lungs, and spleen of surviving chickens at 48 h post-infection, were also significantly reduced in
286 chickens infected with the Δ *prt* mutant when compared to CH138 (pEC598) parent. The
287 complemented strain, however, only demonstrated a significant increase in the liver compared to
288 the Δ *prt* mutant (Fig. 21F). This observation could be explained because half of the infected
289 chickens for the CH138 pEC598 Δ *prt* group were dead 48 post-infection and the data for those
290 dead chickens were not considered.

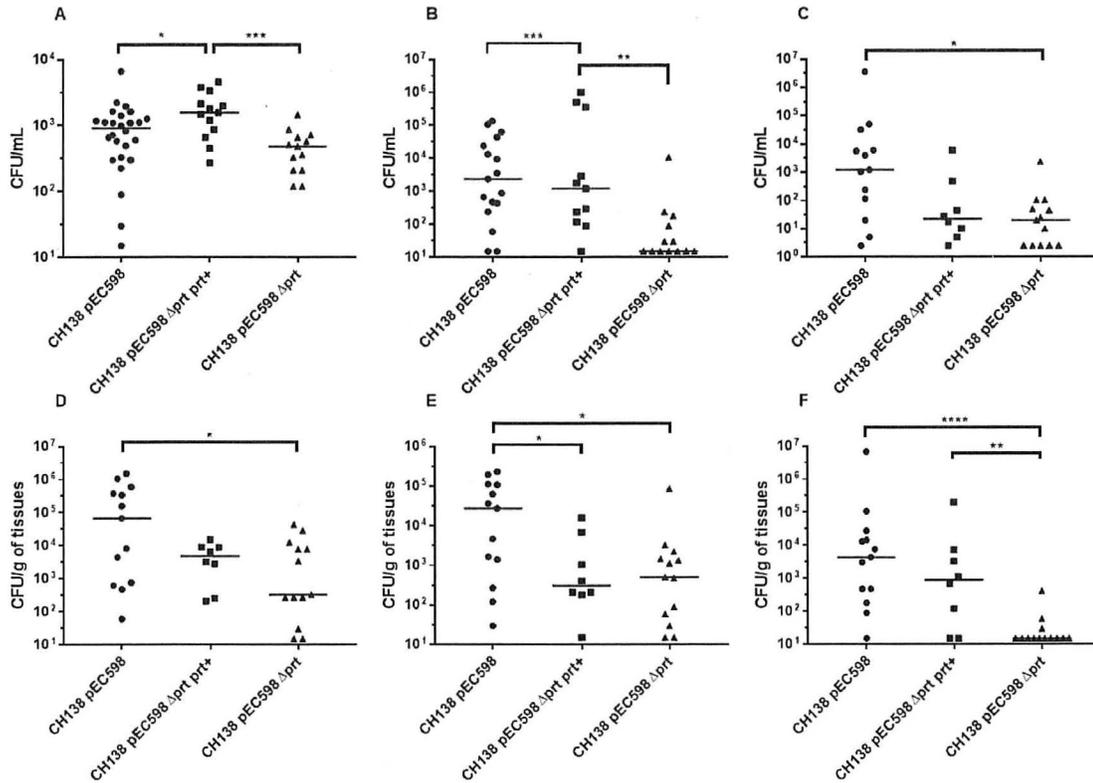


291

292 *Figure 20 : Survival rates of the chickens during the 48 hours of infection.*

293 *The graph shows the survival rates of wild-type strain CH138 pEC598, the isogenic mutant CH138 pEC598 Δprt, and*
 294 *the complementation CH138 pEC598 Δprt prt+. Statistical differences are noted : * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, Mantel-Cox*
 295 *Test (Logrank Test).*

296



297

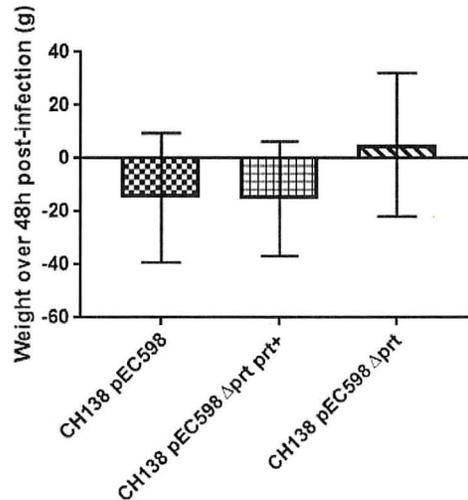
298 *Figure 21 : Role of the Prt toxin for E. coli CH138 in the avian model of arian sac infection.*

299 *Bacterial numbers present in the blood at 6-24 and 48 hours (A, B and C respectively), in the lungs (D), spleens (E),*
 300 *and livers (F) of chickens infected. The results are reported as CFU per gram of tissue or milliliter of blood. The strains*
 301 *used were the wild type APEC strain CH138 containing the plasmid pEC598, the isogenic mutant of the prt gene (CH138*
 302 *pEC598 Δ prt), and the attTn7 complementation of prt of the isogenic mutant (CH138 pEC598 Δ prt prt⁺). Data points*
 303 *represent bacterial counts from tissues isolated from different chickens (n=6-13) 48h post-infection. Statistical*
 304 *differences are noted : * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001, **** p < 0.0001, Mann-Whitney Test.*

305

306 To further characterize the importance of PrtA, we evaluated macroscopic lesions in the
 307 air sacs, pericardial sac and liver at the time of necropsy. Gross lesions of colibacillosis present
 308 in the air sacs, livers, and pericardia of infected chickens were seemingly in accordance with the
 309 bacterial levels observed in different tissues (Table V). Gross lesions were present in the air sacs,
 310 livers, and pericardia of chickens infected with APEC strains. Lesions were slightly less in the
 311 organs of chickens infected with the CH138 (pEC598 Δ prt) mutant compared to the CH138
 312 pEC598 or complemented mutant strains. Furthermore, the chickens were weighed during the 48
 313 hours of infection (Fig. 22). The wild-type CH138 pEC598 and the CH138 pEC598 Δ prt prt⁺ strains
 314 appeared to have had lost weight during infection while the mutant CH138 pEC598 Δ prt strain
 315 appeared to have slightly gained weight, although there were no significant differences in weight
 316 due to variability among individuals.

317 Taken together, these results indicate that the Prt toxin contributes an important role for virulence
 318 and lethality of chickens and increased colonization of extra-intestinal tissues following air sac
 319 infection.



320

321 Figure 22 : : Weight differences between chickens (n = 6-13) before and after the infections.

322 The strains used were the wild type APEC strain CH138 containing the plasmid pEC598, the isogenic mutant of the prt
 323 gene (CH138 pEC598 Δprt), and the attTn7 complementation of prt of the isogenic mutant (CH138 pEC598 Δprt prt+).

324

325 Table V : Production of lesions in air sacs and extra-respiratory organs of chickens inoculated with APEC strains CH138
 326 (pEC598), the isogenic CH138 (pEC598) Δprt mutant and the complemented mutant.

Strains	Mean Lesion Score ± SD		
	Air Sac ^a	Pericardium ^b	Liver ^c
CH138 pEC598	2,38 ± 0,70	1,83 ± 0,26	0,67 ± 0,26
CH138 pEC598 Δprt prt+	2,53 ± 0,57	1,75 ± 0,27	1,13 ± 0,44
CH138 pEC598 Δprt	2,17 ± 0,72	1,23 ± 0,67	0,58 ± 0,33

327

328 ^a Lesion scoring values for severity of aerosacculitis ± standard deviation: 0, normal; 1, slight edema; 2, mild diffuse
 329 thickening and neovascularization of air sacs with mild fibrinous exudate; 3, moderate fibrinous exudate; 4, severe
 330 extensive fibrinous exudate.

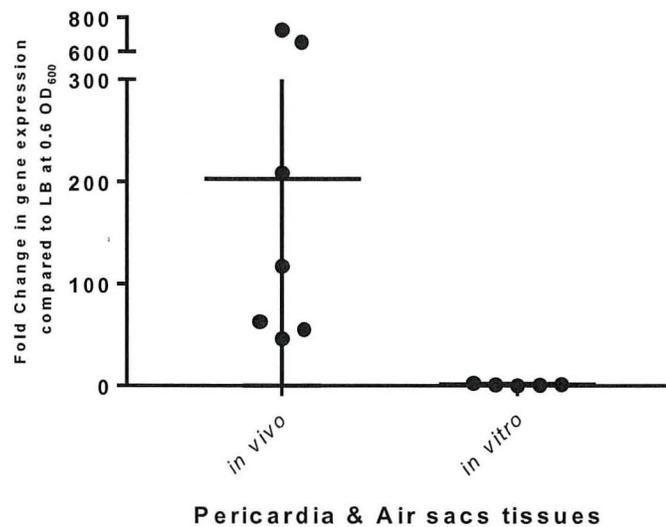
331
 332 ^b Combined lesion scoring values for severity of pericarditis and perihepatitis ± standard deviation. Heart and
 333 pericardium: 0, normal; 1, vascularization, opacity, cloudy fluid in the pericardial cavity; 2, acute pericarditis.
 334

335 ^c Combined lesion scoring values for severity of pericarditis and perihepatitis ± standard deviation. Liver: 0, normal; 1,
 336 slight amounts of fibrinous exudate; 2, marked perihepatitis.

337

338 ***prtA* gene expression is greatly increased in chicken air sacs**

339 The levels of expression of the *prtA* gene from samples grown in LB culture at OD₆₀₀ as well as
340 from infected chicken air sacs and pericardia were determined. The *prtA* gene was upregulated
341 by 200-fold in the infected chicken air sacs and pericardia compared to LB media (Fig. 23).
342 However, expression levels of the complemented CH138 pEC598 $\Delta prt prt^+$ strains were not
343 significantly different in air sacs and pericardia when compared to expression during culture in LB.
344 ΔC_t of the LB culture at OD₆₀₀ was significantly different from the ΔC_t of the one from the infected
345 air sacs and pericardia ($p < 0.001$).



346

347

348 Figure 23 : Differential expression of *prtA* gene occurs in vitro and in chicken tissues.

349 *qRT-PCR* analysis of *prtA* gene transcription from CH138 pEC598 strain grown in different conditions. Growth in rich
350 medium (LB) to OD_{600nm} of 0.6 was used as a standard. RNAs were also extracted from infected chicken pericardia and
351 air sacs tissues. Transcription of *prtA* gene was significantly increased in infected tissues in CH138 pEC598 strain. ***
352 $p < 0,001$, Student *t*-test, shows here the difference in ΔC_t between LB at OD_{600nm} and infected tissues of the pericardium
353 and air sacs. See methods section for details concerning the calculation of gene expression levels. Expressions of *prtA*
354 gene in CH138 pEC598 $\Delta prt prt^+$ were similar under in vivo and in vitro conditions.

355

356 **DISCUSSION :**

357 The RTX toxins contribute to the virulence of pathogenic *E. coli*, *V. cholerae* and other Gram-
358 negative pathogens, and can function as cytolytic toxins, metalloproteases, and lipases (Lally, Hill
359 et al. 1999, Welch 2001). RTX toxins play a major role in virulence due to their pore-forming ability
360 in different kind of cells, which can lead to degradation of host cell substrates and elicit an

361 inflammatory response. In pathogenic *E. coli*, the Hly or Ehx RTX toxins contribute to virulence in
362 humans and other animals (Johnson 1991). Similarly, in *A. pleuropneumoniae* the Apx systems
363 (ApxI, ApxII and ApxIII) (Frey 2011), or the Rtx system in *V. cholerae* play a role in virulence
364 (Satchell 2007). We assessed the role of Prt RTX toxin identified from an APEC strain in cell
365 cytotoxicity assays and during infection in a chicken infection model. APEC strains contain
366 virulence genes also found in human ExPEC (Johnson and Russo 2002, Kaper, Nataro et al.
367 2004, Ewers, Li et al. 2007, Johnson, Kariyawasam et al. 2007, Dziva and Stevens 2008,
368 Krishnan, Chang et al. 2015). APEC strain QT598 belongs to serogroup O1, which is common
369 among both APEC and human ExPEC strains. However, this strain was found to have a large 201
370 kb ColV-like plasmid, pEC598, containing a distinct region predicted to encode a fimbrial system,
371 a serine protease autotransporter system and a RTX toxin system (Fig. 13). Further, the ColV-
372 plasmid was shown to contain a non-functional aerobactin siderophore system due to a
373 pseudogene in *iucC* that resulted in loss of aerobactin synthesis. The aerobactin siderophore
374 system is often encoded on ColV plasmids by APEC and is an important virulence factor that
375 provides a growth advantage by favouring bacterial iron acquisition (Caza, Lépine et al. 2011).
376 Thus, since aerobactin is not encoded by pEC598, we hypothesized that the genes encoded by
377 the distinct region could contribute to virulence. This was confirmed by deletion of this region from
378 pEC598, which led to our naming of this region as the Enhanced Virulence Island (EVI). Studies
379 done in our lab showed the cumulative importance of SPATE autotransporters including the Sha
380 autotransporter during infection in a mouse urinary tract model (Habouria, Pokharel et al. 2019).
381 Indeed, the SPATEs were shown to have cytopathic effects on bladder cells and to be important
382 in the colonization of kidneys (Habouria, Pokharel et al. 2019). Herein, a main objective of this
383 work was to compare a typical ColV-plasmid that produces most of the established virulence
384 genes including aerobactin with the pEC598 ColV plasmid, which lacks a functional aerobactin
385 system, but contains the distinct EVI region and the novel Prt RTX toxin. This was achieved by
386 using derivatives of APEC O1 strain CH138 containing its native ColV plasmid or wherein
387 derivatives of pEC598 were introduced to replace the CH138 ColV plasmid. Importantly, this
388 approach demonstrated that the pEC598 plasmid confers increased virulence to CH138 compared
389 to its native ColV plasmid. Further, a critical role for the new RTX toxin, Prt, for virulence was also
390 established in the chicken infection model.

391 In this study, we identified a new RTX toxin system, *prtCABD*, encoded on a distinct region of a
392 plasmid in an ExPEC strain. Prevalence of the *prt* sequences among APEC and UPEC
393 demonstrated that *prtCABD* was present in 0.86% of UPEC strains and all belonged to

394 phylogenetic group B2. In APEC, *prt* sequences were present in 1.96% of the APEC strains (Fig.
395 14). Phylogenetic analyses of the gene products, combined with the lower G-C content of *prt*
396 genes suggest, the likelihood of horizontal transfer of this new RTX encoding operon with one of
397 the members of the *Pasteurellaceae* family. Moreover, the PrtA protein also contained pre-repeat
398 nonapeptides within its protein sequence. Such pre-repeats are also found in other members of
399 the RTX family such as *A. pleuropneumoniae*, *K. kingae*, *M. haemolytica*, *A. equuli* and were also
400 present in other predicted Rtx systems in *Cronobacter sakazakii* and *Cronobacter malonicus*.
401 These RTX toxins thus represent a specific subgroup, that contain pre-repeats nonapeptides in
402 addition to an additional repeat region. We have therefore suggested they be termed as the Prt
403 (pre-repeats in toxin) group of RTX toxins.

404 When expressed from a high-copy plasmid, Western Blot and hemolysis activity assays confirmed
405 the importance of all 4 genes of the Prt system to obtain a functional toxin with PrtC being required
406 for acylation/activation of the PrtA toxin and PrtBD both being required for export of PrtA into the
407 extracellular environment (Fig. 15). The use of a cloned copy in a *E. coli* strain also demonstrated
408 that PrtA demonstrates hemolytic activity to erythrocytes from a broad range of hosts species.
409 However, erythrocytes may not be the main cell target of PrtA (Fig. 18), since no hemolytic activity
410 was seen on blood agar plates, when Prt was naturally expressed from the pEC598 plasmid in
411 different *E. coli* strains. Our results also showed that the presence of the operon *prtCABD* allowed
412 the bacteria possessing them to had cytopathic effects on different cells such as avian fibroblasts,
413 human macrophages, urothelial cells and kidney cells supporting the idea of the broad range of
414 host cell types that could be targeted by Prt (Fig. 19).

415 Prt was shown to be important for virulence of an APEC strain in a 3-week-old-chicken infection
416 model (Fig. 20, Fig. 22). Replacement of the native ColV plasmid of strain CH138 with the pEC598
417 plasmid resulted in a significantly higher level of virulence and chick lethality. Importantly, the loss
418 of the Prt system from this strain attenuated virulence and lowered bacterial numbers in systemic
419 organs and blood. Further, the *prt* complemented strain regained virulence and increased bacterial
420 numbers in the chick infection model.

421 Although no hemolytic phenotype is evident on growth *in vitro* on blood agar plates, it is notable
422 that the expression of the *prt* system is upregulated *in vivo* or from host tissues. In our infection
423 studies in chickens we determined by qRT-PCR that *prtA* expression was greatly increased from
424 chicken airsac and pericardial tissues (Fig. 23). Further, when testing *prtA* expression during
425 infection of the mouse bladder compared to growth *in vitro*, it was found to be increased a mean

426 of 7-fold. Taken together, Prt represents a new RTX toxin that can contribute to virulence of
 427 pathogenic *E. coli*.

428 It will be of interest to more fully elucidate how this new RTX system effects the host immune cell
 429 function as well as what factors may control its regulation of expression during infection.

430 **MATERIALS AND METHODS :**

431 **Strains, media and PCR screening**

432 Strains and plasmids are listed in Table IV. The 697 *E. coli* strains isolated from urinary tract
 433 infections were clinical isolates from Guadeloupe. Strains were collected by and from laboratories
 434 or hospitals over a period of 17 months and included community or nosocomial urinary tract
 435 infection isolates. The 299 APEC strains were previously described elsewhere (Dozois, Dho-
 436 Moulin et al. 2000). The list of the primers is listed in Table V. The phylogenetic group of strains
 437 was determined by multiplexed PCR as described (Clermont, Christenson et al. 2013). MT156
 438 (QT598) is an APEC serogroup O1 strain that was isolated from the liver of young turkey poultry
 439 (Habouria, Pokharel et al. 2019). *E. coli* strain DH5 α and BL21 were used for gene cloning and
 440 phenotypic tests. APEC strain CH138 is a virulent O1:K1 strain belonging to ST 95 that contains
 441 a typical ColV plasmid which is important for APEC virulence. It was used as the virulent reference
 442 strain to determine the importance of pEC598, the EVI region, and the *prt* genes for virulence in
 443 chickens. Bacteria were grown at 37°C on solid or liquid Lysogeny Broth medium (Alpha
 444 Bioscience, Baltimore, MD) supplemented with the appropriate antibiotics at concentrations of 100
 445 μ g/mL ampicillin, 30 μ g/mL chloramphenicol, 50 μ g/mL of kanamycin or calcium (10mM) when
 446 required. For chicken infection studies, CH138 (pEC598) and mutant derivatives were grown in
 447 brain heart infusion broth (Alpha bioscience).

448 *Table VI : Bacterial strains and plasmids used in this study*

Strain or plasmid	Relevant characteristics	Reference or source
Plasmids		
pGP-Tn7-Cm	pGP-Tn7-FRT::Cm, Amp ^R , Cm ^R	(Crépin, Harel et al. 2012)
pSTNSK-	pST76-K :: <i>tnsABCD</i> , Km ^R	(Crépin, Harel et al. 2012)
pIJ258	pST6K:: <i>tnsABCD</i> , Km ^R	(Crépin, Harel et al. 2012)

pIJ360	pST6K:: <i>tnsABCD</i> , T _p ^R	(Crépin, Harel et al. 2012)
pIJ361	pST6K:: <i>tnsABCD</i> , Cm ^R	(Crépin, Harel et al. 2012)
pIJ479	pUCm-T <i>prtCABD</i> , Ap ^R	This study
pIJ489	pUCm-T <i>prtCABD ΔprtC</i> , Ap ^R	This study
pIJ490	pUCm-T <i>prtCABD ΔprtA</i> , Ap ^R	This study
pIJ491	pUCm-T <i>prtCABD ΔprtB</i> , Ap ^R	This study
pIJ492	pUCm-T <i>prtCABD ΔprtD</i> , Ap ^R	This study
pIJ521	pGP-Tn7-Gm <i>prtCABD</i> , Gm ^R	(Crépin, Harel et al. 2012)
pKD3	Template plasmid for the amplification <i>cat</i> gene bordered by FRT sites	(Datsenko and Wanner 2000)
pKD4	Template plasmid for the amplification <i>km</i> gene bordered by FRT sites	(Datsenko and Wanner 2000)
pKD46	λ-Red recombinase plasmid Ts replicon, Ap ^R	(Datsenko and Wanner 2000)
pCP20	FLP helper plasmid Ts replicon, Ap ^R , Cm ^R	(Datsenko and Wanner 2000)

Strains

QT598	APEC O1 :K, serum resistant	(Marc and Dho-Moulin 1996)
QT4707	QT598 HN-S :: <i>kan</i> , Km ^R	This study
QT4430	DH5-α <i>hlyCABD</i> , Cm ^R	This study
BL21	F- <i>dcm ompT hsdS</i> (_{FB- mB-}) gal [malB ⁺] _{K-12} (λ ^S)	(Studier, Daegelen et al. 2009)
QT4737	BL21 pIJ479, Ap ^R	This study
QT5161	BL21 pIJ489, Ap ^R	This study
QT5162	BL21 pIJ490, Ap ^R	This study
QT5163	BL21 pIJ491, Ap ^R	This study
QT5164	BL21 pIJ492, Ap ^R	This study
DH5-α	F- <i>endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG φ80lacZΔM15 Δ(lacZYA-argF) U169 hsdR17</i> (_{rk mk⁺}) λ-APEC wild-type (O1 :H1 :K7) <i>fyuA sitA chuA irp2 iroN ireA tsh iucD fimC iss ompA vat traT</i> ; contains four plasmids, including pAPEC-O1-CoIBM	Bethesda Research Laboratories (Johnson, Kariyawasam et al. 2007)
CH138		
QT4692	CH138 pEC598 <i>iucD</i> :: <i>cm</i> , Cm ^R	This study
QT5160	CH138 pEC598 <i>iucD</i> :: <i>cm prt::kan</i> , Cm ^R , Km ^R	This study
QT4845	CH138 pEC598 <i>iucD</i> :: <i>cm RU</i> :: <i>kan</i> , Cm ^R , Km ^R	This study
QT5169	CH138 pEC598 <i>iucD</i> :: <i>cm prt::kan att-Tn7-prtCABD::gm</i>	This study
QT5168	CH138 pEC598 <i>iucD</i> :: <i>cm RU</i> :: <i>kan att-Tn7-prtCABD::gm</i>	This study

QT3707	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT3864	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT4039	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT4211	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT4248	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT4378	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT4553	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT4554	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT4558	UPEC clinical strain screened for the presence of <i>prtA</i>	This study
QT775	X7213 DAP ⁻ Km ^R	
QT4459	X7213 DAP ⁻ Km ^R , pEC598- <i>iucD</i> ::Cm	This study

449

450 Table VII : Primers used in this study

Primers	Direction	Characteristic(s)	Sequences 5' → 3'
CMD 100	Forward	<i>tsh</i> for screening	AGT CAG GGG GAT GCA CAG AAA
CMD 101	Reverse	<i>tsh</i> for screening	GCG GTT CTC CCA GTC CTC C
CMD 392	Forward	<i>rpoD</i> for qRT-PCR	GCG TGA AGC GAA AGT TCT GCG TAT
CMD 393	Reverse	<i>rpoD</i> for qRT-PCR	TCG CGG GTA ACG TCG AAC TGT TTA
CMD 1072	Forward	<i>glmS_attTn7</i>	CAC CAA TCT TCT ACA CCG T CGC
CMD 1103	Forward	<i>tnsC</i> for screening	AAC GCA AAG ATG CGC TGT TAT CGG
CMD 1104	Reverse	<i>tnsC</i> for screening	AGT TCT GAC ACT ACC GTT TCG CCT
CMD 1152	Forward	<i>tus</i> for qRT-PCR	CGA TAA CCT TTC GCA AGC AGC GTT
CMD1153	Reverse	<i>tus</i> for qRT-PCR	GGC AAA TGA CGA TGC ACC CAT TCA
CMD 1297	Forward	Cassette <i>gentamycine</i>	TAA GAC ATT CAT CGC GCT TG
CMD 1789	Forward	<i>prtA</i> for screening	AGG GCA GCA TCA CTC TGA AC
CMD 1790	Reverse	<i>prtA</i> for screening	GAA TGT GGT CGT GTC CAT CG
CMD 1802	Forward	<i>prtCABD</i> cloning	ACA AGG ATC CAG GTA TTG TCG GTA TTC GAT ATG AG
CMD 1803	Reverse	<i>prtCABD</i> cloning	GAC CTC TAG ATG TTG GCT ACT CCC GAC ATA
CMD 1804	Forward	<i>prt</i> for screening	GCA AAA GAT GCT ATC GCC GTG
CMD 1805	Reverse	<i>prt</i> for screening	CGT TTC ACT GGC TAC GTT CAG
CMD 1903	Forward	Amplification of <i>prtC</i>	ACA AGA CTA GTC ACA GAA TTT CAT GCA GGT AAG GTC G
CMD 1904	Reverse	Amplification of <i>prtC</i>	TGA AGA CTA GTA CAT CCC CAA AGC CAG GCG G
CMD 1905	Forward	Amplification of <i>prtA</i>	GCT TCA CTA GTT CCG AAG TCG ACA AGC CCC AG
CMD 1906	Reverse	Amplification of <i>prtA</i>	CCC AGA CTA GTC GCT GCG AGC GCC AAA TCT TTC
CMD 1907	Forward	Amplification of <i>prtB</i>	ATC GGA CTA GTA CCG TGA GGA TGG CTG ACC G
CMD 1908	Reverse	Amplification of <i>prtB</i>	ATA CTA CTA CTG CAT GAC CAG CGC AGA AAG TGC

CMD 1909	Forward	Amplification of <i>prtD</i>	AAT CAA CTA GTT CCC GTA GCC GTT TGG GAG C
CMD 1910	Reverse	Amplification of <i>prtD</i>	AAT CAA CTA GTT CCC GTA GCC GTT TGG GAG C
CMD 1911	Forward	Amplification of <i>prtCABD</i>	AGGCCTGGCTGCATGTTGAAAAATAAACT ATTAAATTTTACGTATATGGTGTAGGCTGG AGCTGCTTC
CMD 1912	Reverse	Amplification of <i>prtCABD</i>	TTTGTGGCTACTCCCGACATAGCAAGAAT AACGTTTCAGTCATGCTCTCATGGGAATTAC CATGGTCC
CMD 1941	Forward	Δ <i>prtC</i> for screening	GCG CCT TGC CAT CCT GTC AC
CMD 1942	Reverse	<i>prtD</i> for screening	CGA TAC CAT GCA AGT AAC CGT GAC GAG
CMD 2519	Forward	<i>prtA</i> for qRT-PCR	GAC GCC CAC TTC AGA ATC AC
CMD 2520	Reverse	<i>prtA</i> for qRT-PCR	ATC GGC AAT CGT GCT GGT AT

451

452 **Bioinformatic analysis**

453 The presence of the *prtCABD* sequence *in silico* was determined by Blastp analysis against
 454 several *E. coli* genomes available from the NCBI database (Altschul, Gish et al. 1990). The
 455 phylogenetic trees were constructed by using the PhyML/bootstrapping in MEGA 6 program with
 456 sequence alignment by Clustal W and the "Neighbor-Joining Tree" algorithm was used (Tamura,
 457 Stecher et al. 2013).

458 **Genetic and DNA manipulations**

459 Plasmid DNA was extracted using the EZ DNA Miniprep kit (Bio Basic, Markham, Ontario,
 460 Canada). PCR products and DNA were purified using the EZ-10 Spin Column PCR Product
 461 Purification Kit (Bio Basic, Markham, Ontario, Canada). DNA for RTX-encoding genes was
 462 amplified using Q5 High Fidelity-DNA polymerase (New England Biolabs, Inc).

463 **Construction of plasmids**

464 *Prt*-encoding genes were amplified by PCR using specific primers (listed in Table IV). The
 465 *prtCABD* genes were amplified from QT598 and cloned into pUCmT to generate pUCmT-
 466 *prtCABD*. Amplification of the *prtCABD* genes was performed with primers CMD1802 and
 467 CMD1803 using the high-fidelity enzyme Q5 (NEB) with a hybridization temperature of 60°C.
 468 Following purification of the amplified DNA fragment, there was incubation with Taq-polymerase
 469 (Bio Basic Inc) to add adenines at the ends of the DNA fragment. Subsequently, the fragment was
 470 incubated with the linear plasmid (Bio Basic Inc) having thymines at the ends with a ligase

471 (Fermentas). The ligation was then transformed into *Escherichia coli* K-12 strain DH5- α and the
472 spreading was carried out on LB solid medium with ampicillin, IPTG and X-gal.

473 Avian Pathogenic *E. coli* strain CH138 pEC598 harboring the complementation of the *prtCABD*
474 operon was obtained by site-specific transposition of the *prtCABD* genes at the
475 chromosomal *attTn7* site as described by Crépin et al. (2012) (Crépin, Harel et al. 2012). First, the
476 *prtCABD* genes and their promoter were amplified with the primers CMD1802 and CMD1803. This
477 DNA fragment was digested with KpnI and XhoI (New England Biolabs), purified with the Biobasic
478 kit and ligated into the multiple-cloning sites (MCS) of the mini-Tn7-containing vector pGP-Tn7-
479 Gm, generating the vector pGP-Tn7-*prtCABD* (pIJ521).

480 **Mutagenesis of Prt**

481 Avian Pathogenic *E. coli* strain CH138 was used for the chicken infection model. The strain QT775
482 was conjugated with the plasmid, pEC598 *iucD::Cm* and grown on LB culture supplemented with
483 DAP. The transconjugants QT4459 was then selected on LB DAP Km Cm agar plates. Afterwards
484 CH138 pECCH138 was conjugated with QT4459 strain on LB culture supplemented with DAP.
485 The transconjugants QT4692 were then selected on LB Cm agar media.

486 Mutants were generated using the lambda red recombinase method (Datsenko and Wanner
487 2000). The *prtCABD* genes were replaced with a kanamycin resistance cassette, from plasmid
488 pKD13 with the knockout primers: 2094 and 2095 (Table IV). PCR products were electroporated
489 into QT598 containing the lambda red recombinase-expressing plasmid pKD46. Deletion of the
490 *prt* genes was confirmed by PCR with screening primers CMD 1789 and 1790 (Table IV). The
491 kanamycin resistance cassette, flanked by FLP recombination target (FRT) sequences, was
492 removed by the introduction of plasmid pCP20 expressing the FLP recombinase (Cherepanov and
493 Wackernagel 1995). The *prt* genes were replaced with a gentamycin-resistance cassette by allelic
494 exchange as detailed in (Dozois, Dho-Moulin et al. 2000). Mutants of QT598 lacking multiple *prt*-
495 encoding genes, including a derivative lacking all four *prt* genes, Δ *prt*, were generated.

496 Strain containing pGP-Tn7-*prtCABD* was conjugated overnight with strain CH138 pEC598
497 *iucD::cm prt::kan*, containing plasmid pSTNSK, which encodes the Tn7 *tnsABCD* transposase
498 genes, at 30°C on LB culture supplemented with DAP. Insertion of Tn7 into the *attTn7* site was
499 verified by PCR (primers CMD1789 and CMD1790).

500 **Preparation and protein analysis: Western Blotting**

501 Proteins from supernatant bacterial cultures were prepared as described in (Mahmood and Yang
502 2012). Proteins in the samples were separated by sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel
503 electrophoresis, transferred onto nitrocellulose membrane, and then analyzed with specific
504 antibodies. Anti-PrfA antibodies were of rabbit origin (New England Peptide, USA). Species-
505 specific antibodies Goat Anti-Rabbit conjugated with peroxidase were used as the secondary
506 antibodies. After binding and washing, the membranes were finally developed with Western Blot
507 Chemiluminescence Reagent (Rockford, USA, ThermoScientific), and the signals were captured
508 by detection of a light signal on GelDoc.

509 **Testing for hemolytic activity**

510 Blood agar plates for hemolytic assays were prepared as follows. Blood was aseptically taken
511 from human, chicken, sheep, horse or swine in the presence of an anticoagulant. Agar plates were
512 then prepared by mixing trypticase-soy-agar (Alpha Biosciences Inc., Baltimore, USA)
513 supplemented with 10 mM CaCl₂ and 5% blood.

514 This protocol was modified from that found in Harshman's work (Bernheimer 1988, Harshman,
515 Sugg et al. 1988). In order to determine the erythrocytes percentage of the different kind of bloods,
516 we firstly tested hemolysis in liquid. Blood cells were prepared as a 1% solution by adding 0.5 mL
517 of blood at 2% of erythrocytes to 3.5 mL of water, followed by centrifugation and reading the optical
518 density of the supernatant at 545 nm. The value obtained must be 0.30 ± 0.02 characterizing a
519 50% of hemolysis, allowing us to determine the erythrocytes percentage of our blood. Bacterial
520 cultures were adjusted to a concentration of 2×10^7 bacteria/mL. 100 μ L of a 2% blood suspension
521 was prepared and mixed with 100 μ L of the bacterial solution, and then incubated at 37°C for 4
522 hours. The supernatants of samples were then obtained after centrifugation (5min, 500g) and its
523 optical density at 545 nm was determined.

524 **Infection of host cells *in vitro***

525 The CEC-32 avian fibroblasts were cultured in DMEM (Wisent Inc) with 10% fetal bovine serum
526 (FBS) (HyClone) and the cells were plated in 96 wells the day before infection at 5×10^4 cells per
527 well. THP-1 monocytes (ATCC TIB-202) and 5637 urothelial cells (ATCC HTB-9TM) were cultured
528 in supplemented RPMI medium (25 mM HEPES, 4 mM L-glutamine, 10% FBS, 0.1 mM non-
529 essential amino acids, 1mM sodium pyruvate) (Wisent Inc), while the urothelial cells were plated
530 in 96 wells the day before infection at a quantity of 5×10^4 cells per well, the monocytes were plated
531 48 hours before infection at a concentration of 8×10^4 cells per well in the presence of PMA to
532 promote adhesion and their differentiation into macrophages. All cells were incubated at 37°C and

533 5% CO₂. Renal HEK-293 cells (ATCC CRL-1573TM) were cultured in DMEM supplemented with
534 10% FBS, 10 mM HEPES, 1% non-essential amino acids and 1 mM sodium pyruvate. Five mL
535 cultures of LB were diluted to obtain a MOI of 10:1, or 10 bacteria per eukaryotic cell. Then, the
536 culture medium was removed from the 96-well plate and the cells washed with HBSS, and the
537 plate was inoculated with 200 µL of bacteria. Following centrifugation of the plate at 200xg for 5
538 minutes, it was incubated at 37°C and 5% CO₂ for 3 hours. The cells were then washed three
539 times with PBS and stained with Giemsa following the manufacturer's protocol (Fisher Scientific)
540 and visualized under a microscope.

541 **Experimental infection of chickens via the air sac**

542 Chickens were maintained in specific-pathogen-free conditions and all experiments were
543 approved by the "Comité Institutionnel de Protection des Animaux". A single-strain challenge
544 model was used to investigate the contribution of the *prt* genes to the virulence of APEC. For this
545 purpose, 3-week-old Layers chickens (White Leghorn, ACIA, Ottawa) were inoculated in the left
546 thoracic air sac with 10⁸ CFU of the APEC strain CH138 (pEC598), isogenic mutant Δ*prt* mutant,
547 or its complemented derivative. At 6, 24, and 48 h post-inoculation, blood was collected for plating
548 on Mac Conkey agar medium. At 48 h post-inoculation, chickens were euthanized and examined
549 for macroscopic lesions. The spleen, lung, and liver were aseptically collected, weighed, and
550 homogenized. Bacterial numbers were determined by plating serial dilutions of the homogenates
551 on selective Mac Conkey agar medium.

552 **qRT-PCR analysis of *prt* gene expression *in vivo* and *in vitro***

553 Expression of the *prtA* gene was determined after growth in LB medium or from infected chicken's
554 tissues of the pericardium and air sacs. Total RNAs were extracted following the EZ-10 Spin
555 Column Total RNA Miniprep Kit protocol (BioBasic). RNA samples were then first treated with
556 DNase I (QIAGEN) and then with Turbo DNase (Ambion). PCR (40 cycles) were used to ensure
557 lack of DNA contamination. cDNAs were produced by using the SuperScript RT III reverse
558 transcriptase (Invitrogen) according to the Transcript® All-in-One First-Strand cDNA Synthesis
559 SuperMix for qPCR protocol (Trans). The RNA polymerase sigma factor *rpoD* gene and the DNA
560 replication terminus site-binding protein *tus* gene were used as house-keeping controls. Primers
561 designed to amplify *rpoD*, *tus* and *prtA* are presented in Table 3. Two µL of cDNA and 10 µM of
562 each primer set were mixed with 10 µL of TransStart® Tip Green qPCR Supermix (Trans) per
563 PCR tubes. Assays were performed in triplicate on a qPCR RG-3000 Corbett Rotorgene (Thermo
564 Fisher) instrument. All data were normalized to *rpoD* or *tus* expression levels. Melting-curve

565 analysis was verified to differentiate accumulation of Evagreen bound DNA and determine that
566 signal was gene-amplification specific and not due to the primer dimer formation. The data were
567 analyzed by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method (Livak and Schmittgen 2001).

568 **Statistical analysis**

569 For chicken infection experiments, the Mann-Whitney test was used to compare the samples by
570 pairs, and the Kruskal-Wallis test was used to compare groups. *P*-values of < 0.05 were
571 considered statistically significant. All data were analyzed with the Graph Pad Prism 7 software
572 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

573 **DNA Sequence accession numbers:**

574 *Escherichia coli* strain QT598 plasmid pEC598 : KP119165.1

575 **Ethics statement**

576 The protocol for chicken air sac infection was approved by the animal ethics evaluation committee
577 – *Comité Institutionnel de Protection des Animaux* (CIPA No 1505-04) of the INRS-Institut Armand-
578 Frappier.

579 **Acknowledgments**

580 Funding for this work was supported by NSERC Canada Discovery Grants 2014-06622 and 2019-
581 06642 (C.M.D.) and a collaborative ACIP grant from the Institut Pasteur International Network
582 (C.M.D).

583

584

REFERENCES FOR ARTICLE MANUSCRIPT

1. Croxen, M.A. and B.B. Finlay, *Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity*. Nature Reviews Microbiology, 2010. **8**(1): p. 26.
2. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nature reviews microbiology, 2004. **2**(2): p. 123.
3. Johnson, J.R. and T.A. Russo, *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "the other bad E coli"*. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 2002. **139**(3): p. 155-162.
4. Clermont, O., et al., *Animal and human pathogenic Escherichia coli strains share common genetic backgrounds*. Infection, genetics and evolution, 2011. **11**(3): p. 654-662.
5. Guabiraba, R. and C. Schouler, *Avian colibacillosis: still many black holes*. FEMS microbiology letters, 2015. **362**(15): p. fnv118.
6. Dziva, F., et al., *Sequencing and functional annotation of avian pathogenic Escherichia coli serogroup O78 strains reveal the evolution of E. coli lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms*. Infection and immunity, 2013. **81**(3): p. 838-849.
7. Johnson, T.J. and L.K. Nolan, *Pathogenomics of the virulence plasmids of Escherichia coli*. Microbiol. Mol. Biol. Rev., 2009. **73**(4): p. 750-774.
8. Dale, A.P. and N. Woodford, *Extra-intestinal pathogenic Escherichia coli (ExPEC): disease, carriage and clones*. Journal of Infection, 2015. **71**(6): p. 615-626.
9. Johnson, J.R., *Virulence factors in Escherichia coli urinary tract infection*. Clinical microbiology reviews, 1991. **4**(1): p. 80-128.
10. Bergthorsson, U. and H. Ochman, *Distribution of chromosome length variation in natural isolates of Escherichia coli*. Molecular Biology and Evolution, 1998. **15**(1): p. 6-16.
11. Dho-Moulin, M. and J.M. Fairbrother, *Avian pathogenic Escherichia coli (APEC)*. Veterinary research, 1999. **30**(2-3): p. 299-316.
12. Dziva, F. and M.P. Stevens, *Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts*. Avian Pathology, 2008. **37**(4): p. 355-366.
13. Dozois, C.M., F. Daigle, and R. Curtiss, *Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic Escherichia coli strain*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2003. **100**(1): p. 247-252.
14. Dozois, C.M., et al., *Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian Escherichia coli and localization and analysis of the Tsh genetic region*. Infection and immunity, 2000. **68**(7): p. 4145-4154.
15. Mellata, M., et al., *Role of avian pathogenic Escherichia coli virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages*. Infection and immunity, 2003. **71**(1): p. 494-503.
16. Johnson, T.J., S.J. Johnson, and L.K. Nolan, *Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic Escherichia coli suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids*. Journal of bacteriology, 2006. **188**(16): p. 5975-5983.
17. Ewers, C., et al., *Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: how closely related are they?* International Journal of Medical Microbiology, 2007. **297**(3): p. 163-176.
18. Terlizzi, M.E., G. Gribaudo, and M.E. Maffei, *UroPathogenic Escherichia coli (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies*. Frontiers in microbiology, 2017. **8**: p. 1566.
19. Habouria, H., et al., *Three new serine-protease autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic Escherichia coli and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney*. Virulence, 2019. **10**(1): p. 568-587.
20. Welch, R., *RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology*, in *Pore-Forming Toxins*. 2001, Springer. p. 85-111.

21. Frey, J. and P. Kuhnert, *RTX toxins in Pasteurellaceae*. International journal of medical microbiology, 2002. **292**(3-4): p. 149-158.
22. Stanley, P., et al., *Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of Escherichia coli hemolysin*. Science, 1994. **266**(5193): p. 1992-1996.
23. Linhartová, I., et al., *RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism*. FEMS microbiology reviews, 2010. **34**(6): p. 1076-1112.
24. Wiles, T.J. and M.A. Mulvey, *The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic Escherichia coli: progress and perspectives*. Future microbiology, 2013. **8**(1): p. 73-84.
25. Coote, J., *Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria*. FEMS microbiology reviews, 1992. **8**(2): p. 137-161.
26. Bauer, M.E. and R.A. Welch, *Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic Escherichia coli O157: H7*. Infection and immunity, 1996. **64**(1): p. 167-175.
27. Marc, D. and M. Dho-Moulin, *Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of Escherichia coli: serogroup-specific sites within fimA and nucleotide sequence of fimI*. Journal of medical microbiology, 1996. **44**(6): p. 444-452.
28. Dozois, C.M., et al., *pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with Escherichia coli isolated from septicemic chickens and turkeys*. Infection and Immunity, 1992. **60**(7): p. 2648-2656.
29. Guyomard-Rabenirina, S., et al., *Temporal trends and risks factors for antimicrobial resistant Enterobacteriaceae urinary isolates from outpatients in Guadeloupe*. BMC microbiology, 2016. **16**(1): p. 121.
30. Muto, A. and S. Osawa, *The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1987. **84**(1): p. 166-169.
31. Kuhnert, P. and H. Christensen, *Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects*. 2008: Horizon Scientific Press.
32. Cheetham, B.F. and M.E. Katz, *A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants*. Molecular microbiology, 1995. **18**(2): p. 201-208.
33. Cortajarena, A.L., F.M. Gofii, and H. Ostolaza, *Asp-863 is a key residue for calcium-dependent activity of Escherichia coli RTX toxin α -haemolysin*. FEBS letters, 2003. **546**(2-3): p. 271-275.
34. Wang, J.F., et al., *Molecular and biochemical mechanisms of Pasteurella haemolytica leukotoxin-induced cell death*. Microbial pathogenesis, 1998. **25**(6): p. 317-331.
35. Goebel, W. and J. Hedgpeth, *Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of Escherichia coli*. Journal of bacteriology, 1982. **151**(3): p. 1290-1298.
36. Chatterjee, R., S. Nag, and K. Chaudhuri, *Identification of a new RTX-like gene cluster in Vibrio cholerae*. FEMS microbiology letters, 2008. **284**(2): p. 165-171.
37. Lally, E.T., et al., *The interaction between RTX toxins and target cells*. Trends in microbiology, 1999. **7**(9): p. 356-361.
38. Frey, J., *The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic Pasteurellaceae*. Veterinary microbiology, 2011. **153**(1-2): p. 51-58.
39. Satchell, K.J.F., *MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins*. Infection and immunity, 2007. **75**(11): p. 5079-5084.
40. Johnson, T.J., et al., *The genome sequence of avian pathogenic Escherichia coli strain O1: K1: H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic E. coli genomes*. Journal of bacteriology, 2007. **189**(8): p. 3228-3236.
41. Krishnan, S., et al., *Serotype O18 avian pathogenic and neonatal meningitis Escherichia coli strains employ similar pathogenic strategies for the onset of meningitis*. Virulence, 2015. **6**(8): p. 777-786.

42. Caza, M., F. Lépine, and C.M. Dozois, *Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 2011. **80**(1): p. 266-282.
43. Clermont, O., et al., *The Clermont Escherichia coli phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups*. *Environmental microbiology reports*, 2013. **5**(1): p. 58-65.
44. Altschul, S.F., et al., *Basic local alignment search tool*. *Journal of molecular biology*, 1990. **215**(3): p. 403-410.
45. Tamura, K., et al., *MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0*. *Molecular biology and evolution*, 2013. **30**(12): p. 2725-2729.
46. Crépin, S., J. Harel, and C.M. Dozois, *Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in Enterobacteriaceae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2012. **78**(17): p. 6001-6008.
47. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. **97**(12): p. 6640-6645.
48. Cherepanov, P.P. and W. Wackernagel, *Gene disruption in Escherichia coli: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant*. *Gene*, 1995. **158**(1): p. 9-14.
49. Bernheimer, A.W., [30] *Assay of hemolytic toxins*, in *Methods in enzymology*. 1988, Elsevier. p. 213-217.
50. Harshman, S., N. Sugg, and P. Cassidy, [1] *Preparation and purification of staphylococcal alpha toxin*, in *Methods in enzymology*. 1988, Elsevier. p. 3-7.
51. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method*. *methods*, 2001. **25**(4): p. 402-408.
52. Saitou, N. and M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Molecular biology and evolution*, 1987. **4**(4): p. 406-425.
53. Kolodrubetz, D., et al., *Cloning and expression of the leukotoxin gene from Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infection and immunity*, 1989. **57**(5): p. 1465-1469.
54. Chang, Y., R. Young, and D.K. Struck, *The Actinobacillus pleuropneumoniae hemolysin determinant: unlinked appCA and appBD loci flanked by pseudogenes*. *Journal of bacteriology*, 1991. **173**(16): p. 5151-5158.
55. Frey, J., et al., *Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from Actinobacillus pleuropneumoniae*. *Infection and immunity*, 1991. **59**(9): p. 3026-3032.
56. Felmler, T., S. Pellett, and R.A. Welch, *Nucleotide sequence of an Escherichia coli chromosomal hemolysin*. *Journal of bacteriology*, 1985. **163**(1): p. 94-105.
57. MacDonald, J. and A.N. Rycroft, *Molecular cloning and expression of ptxA, the gene encoding the 120-kilodalton cytotoxin of Actinobacillus pleuropneumoniae serotype 2*. *Infection and immunity*, 1992. **60**(7): p. 2726-2732.
58. Lo, R., C. Strathdee, and P. Shewen, *Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of Pasteurella haemolytica A1*. *Infection and Immunity*, 1987. **55**(9).
59. Highlander, S.K., et al., *DNA sequence of the Pasteurella haemolytica leukotoxin gene cluster*. *DNA*, 1989. **8**(1): p. 15-28.
60. Berthoud, H., J. Frey, and P. Kuhnert, *Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of Actinobacillus equuli*. *Veterinary microbiology*, 2002. **87**(2): p. 159-174.
61. Studier, F.W., et al., *Understanding the differences between genome sequences of Escherichia coli B strains REL606 and BL21 (DE3) and comparison of the E. coli B and K-12 genomes*. *Journal of molecular biology*, 2009. **394**(4): p. 653-680.

6. Conclusion & Perspectives

La famille des toxines RTX est connue pour contribuer à la virulence de différentes bactéries comme *E. coli*, *V. cholerae* et d'autres bactéries Gram négatives à pathogènes, et elles peuvent être des toxines cytolytiques, des métalloprotéases et des lipases (Lally, Hill et al. 1999, Welch 2001). Les toxines RTX jouent un rôle majeur dans la virulence des bactéries pathogènes de par leur capacité à former des pores induisant ainsi une réponse inflammatoire et la dégradation des substrats des cellules cibles. Chez les ExPEC, les toxines RTX sont des facteurs de virulence importants et il en existe différentes dont les plus connues sont les systèmes Hly et Ehx chez *E. coli* (Johnson 1991), Apx chez *A. pleuropneumoniae* (ApxI, ApxII et ApxIII) (Frey 2011) ou *V. cholerae* (Satchell 2007). Lors de cette maîtrise, le rôle du système Prt a pu être déterminé chez la souche APEC QT598 grâce à des tests de cytotoxicité et des infections des voies aériennes de modèle aviaire. La souche QT598 fait partie du sérotype O1 présent chez les APEC et les ExPEC humains. La souche ExPEC QT598 a initialement été isolée chez une jeune dinde, notre laboratoire a ensuite séquencé cette souche et a découvert la présence d'une région unique sur un plasmide de type ColV, pEC598 (201 kpb). Cette région unique possède 3 systèmes non caractérisés : un système de fimbriae, un système d'autotransporteur et un système de toxine RTX. De plus, le séquençage a permis de mettre en lumière le fait que le plasmide pEC598 possède un pseudo-gène de l'aérobactine, rendant ce dernier non fonctionnel. L'aérobactine est connu pour jouer un rôle important dans la virulence des souches le possédant (Opal, Cross et al. 1990), c'est pourquoi notre laboratoire a assumé que la virulence non diminuée de la souche QT598 malgré l'absence de l'aérobactine, est due à l'un ou plusieurs des systèmes de la région unique de pEC598. Des études réalisées dans nos laboratoires ont montré l'importance de la région unique et des systèmes d'autotransporteurs lors d'infection de modèles aviaires (Habouria, Pokharel et al. 2019). Les nouveaux autotransporteurs présents dans le plasmide pEC598 ont montré leurs effets cytopathiques sur des cellules de la vessie et de leur importance dans la colonisation des reins dans des infections UPEC de modèle d'infection urinaire chez la souris (Habouria, Pokharel et al. 2019). Cependant le but de cette maîtrise fut de comprendre et de caractériser le rôle de cette nouvelle toxine RTX, Prt, et son rôle dans la virulence de modèle d'infection aviaire.

Durant cette maîtrise, nous avons déterminé que l'opéron *prtCABD* appartient à la famille des leucotoxines / hémolysines mais ne fait pas partie des toxines RTX connues selon le séquençage de ce dernier. La séquence de ce nouveau système Prt a été retrouvée dans 0.86% des souches UPEC criblées qui appartenaient toutes au groupe phylogénétique B2 (697 isolats)

et dans 1.9% des souches APEC criblées (306 isolats). Des analyses phylogénétiques couplées avec des comparaisons des contenus en G-C, ont montré une forte homologie, et donc la forte possibilité d'un transfert horizontal de ce nouvel opéron *prtCABD* avec un des membres de la famille des *Pasteurellaceae*. De plus, il est connu que les toxines RTX possèdent des répétitions de nonapeptides et le séquençage du nouveau gène *prtA* codant pour la toxine a révélé la présence de pré-répétitions de ces nonapeptides dans la séquence protéique prédite. La présence de ces pré-répétitions chez d'autres membres de la famille des RTX comme *A. pleuropneumoniae*, *K. kingae*, *M. haemolytica*, *A. equuli* ou *Cronobacter malonicus* et *sakazakii*, créant ainsi un sous-groupe de RTX possédant ces pré-répétitions nonapeptidiques. Les expériences réalisées lors de cette maîtrise ont été faites à partir d'un plasmide à fort nombre de copies dans lequel on a inséré l'opéron *prtCABD*. Les Western Blot et les tests d'hémolyse en sang liquide et solide ont ainsi permis d'observer l'importance des 4 gènes de l'opéron afin d'obtenir une toxine fonctionnelle qui peut par la suite être sécrétée dans le milieu extracellulaire. Ces expériences ont également mis en lumière que *prtCABD* a un effet sur une grande gamme de cellules d'hôtes distincts (humain, poule, dinde, cheval, porc, ...) même si les érythrocytes ne semblent pas être la cible principale de la toxine PrtA. On a aussi pu mettre en avant l'effet cytopathique sur différentes cellules comme les fibroblastes aviaires, les macrophages humains, les cellules urothéliales et les cellules rénales, ce qui suggère une grande gamme d'activité de PrtA contre une diversité de cellules. Des expériences d'infection de la nouvelle toxine Prt ont aussi été réalisées en utilisant une souche virulente d'APEC avec un modèle d'infection de poussins âgés de 3 semaines. La souche mutante (Δ prt) était atténuée dans la colonisation des organes et du sang, tandis que la souche sauvage (CH138 pEC598) ainsi que la souche complémentée (Δ prt prt⁺) ont montré une très bonne capacité à coloniser ces derniers et avaient la capacité de persister durant les 48h des infections. De plus, la souche mutante (Δ prt) ne montrer pas de virulence, car tous les poussins infectés survécurent l'infection tandis que la souche sauvage et la complémentée (Δ prt prt⁺) tuèrent la moitié de la population des poussins infectés avant les 48h post-infection. Les résultats ont ainsi pu montrer l'importance de *prtCABD* dans la colonisation des organes et du développement de lésions chez les poussins, nous faisant ainsi spéculer de l'importance de *prtCABD* dans la virulence des souches pathogénique aviaire d'*E. coli*.

En perspectives, il sera intéressant de mieux caractériser la régulation de l'opéron *prtCABD* car les résultats obtenus *in vitro* le sont grâce à un vecteur à fort nombre de copies alors que les résultats *in vivo* le sont avec le plasmide natif à faible nombre de copies pEC598. Ceci pourrait suggérer une régulation ayant lieu empêchant d'obtenir des toxines fonctionnelles *in vitro*.

Ainsi, une construction de rapporteur de fusion transcriptionnel devra être réalisée, et pour se faire le promoteur de la toxine Prt sera cloné avec l'opéron sans promoteur *luxCDABE*, selon la méthode décrite par (Bessaiah, Pokharel et al. 2019), ce qui créera la construction *prt-lux*. Par la suite, une banque des mutants sera créée par mutagenèses par transposons. Ceci permettra de déterminer les régulateurs du promoteur de l'opéron *prtCABD*, par mesure de la luminescence où les gènes perturbés entraîneront une plus faible ou plus forte luminescence en comparaison à la souche sauvage. Afin de confirmer si les résultats obtenus par mesure de la luminescence, des tests phénotypiques sur géloses sang pourront être réalisés pour voir si un halo d'hémolyse apparaît pour les gènes surexprimés. Pour ce qui est de l'expression *in vitro* du gène *prtA*, les expériences à jour ont été réalisées avec des cultures bactériennes à DO_{600nm} de 0.6 mais cependant il sera intéressant de déterminer l'expression de ce gène dans différentes conditions de culture comme des cultures en phase stationnaire de croissance ou en début de phase exponentielle de croissance, et en comparant le niveau d'expression en milieu minimal, milieu pauvre en fer ou en liquide biologique comme le sérum ou l'urine,

Nos études ont aussi montré que le système Prt a pu être retrouvé uniquement dans les souches UPEC du groupe phylogénétique B2 mais il sera également intéressant de cribler plusieurs autres souches UPEC de différents groupes phylogénétiques afin de déterminer si ce système est présent dans d'autres groupes surtout qu'il est localisé sur un plasmide. De plus, il sera intéressant de déterminer plus en profondeur l'impact que le système Prt peut avoir pour la virulence de ces souches UPEC et leur effet sur la réponse immunologique pendant l'infection. Les toxines de la famille des RTX sont connues pour être situées soit sur de grands plasmides transmissibles, soit être situé au niveau du chromosome sur des îlots de pathogénicité (Kuhnert, Heyberger-Meyer et al. 1997). Ce système Prt n'a pour l'instant été retrouvé uniquement présent sur des plasmides, ainsi il sera intéressant de déterminer si ce système peut être retrouvé également au niveau du chromosome chez certaines souches.

Des recherches supplémentaires sur le rôle potentiel de cette toxine RTX nouvellement identifiée dans la virulence des APEC ainsi que d'autres ExPEC associés aux infections chez l'humain sont donc justifiées. Il sera intéressant de mieux comprendre en quoi ce nouveau système RTX influe sur la virulence des souches APEC et UPEC qui le possèdent, ainsi que sur ses réseaux de régulation bactériens pouvant être rencontrés au cours de la colonisation et l'infection de l'hôte.

Bibliographie :

- Aldick, T., M. Bielaszewska, B. E. Uhlin, H. U. Humpf, S. N. Wai and H. Karch (2009). "Vesicular stabilization and activity augmentation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* haemolysin." Molecular microbiology **71**(6): 1496-1508.
- Aldick, T., M. Bielaszewska, W. Zhang, J. Brockmeyer, H. Schmidt, A. W. Friedrich, K. S. Kim, M. A. Schmidt and H. Karch (2007). "Hemolysin from Shiga toxin-negative *Escherichia coli* O26 strains injures microvascular endothelium." Microbes and infection **9**(3): 282-290.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers and D. J. Lipman (1990). "Basic local alignment search tool." Journal of molecular biology **215**(3): 403-410.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson and F. Rodríguez-Quifones (2003). "Bacterial iron homeostasis." FEMS microbiology reviews **27**(2-3): 215-237.
- Aslani, M. M., M. Y. Alikhani, A. Zavari, R. Yousefi and A. R. Zamani (2011). "Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern." International Journal of Infectious Diseases **15**(2): e136-e139.
- Bakás, L., A. Chanturiya, V. Herlax and J. Zimmerberg (2006). "Paradoxical lipid dependence of pores formed by the *Escherichia coli* α -hemolysin in planar phospholipid bilayer membranes." Biophysical journal **91**(10): 3748-3755.
- Balashova, N. V., R. Diaz, S. V. Balashov, J. A. Crosby and S. C. Kachlany (2006). "Regulation of *Aggregatibacter (Actinobacillus) actinomycetemcomitans* leukotoxin secretion by iron." Journal of bacteriology **188**(24): 8658-8661.
- Balashova, N. V., D. H. Park, J. K. Patel, D. H. Figurski and S. C. Kachlany (2007). "Interaction between leukotoxin and Cu, Zn superoxide dismutase in *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*." Infection and immunity **75**(9): 4490-4497.
- Balashova, N. V., C. Shah, J. K. Patel, S. Megalla and S. C. Kachlany (2009). "*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* LtxC is required for leukotoxin activity and initial interaction between toxin and host cells." Gene **443**(1-2): 42-47.
- Balsalobre, C., J. M. Silván, S. Berglund, Y. Mizunoe, B. E. Uhlin and S. N. Wai (2006). "Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*." Molecular microbiology **59**(1): 99-112.
- Bárcena-Uribarri, I., R. Benz, M. Winterhalter, E. Zakharian and N. Balashova (2015). "Pore forming activity of the potent RTX-toxin produced by pediatric pathogen *Kingella kingae*: Characterization and comparison to other RTX-family members." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1848**(7): 1536-1544.
- Barichello, T., G. D. Fagundes, J. S. Generoso, S. G. Elias, L. R. Simões and A. L. Teixeira (2013). "Pathophysiology of neonatal acute bacterial meningitis." Journal of medical microbiology **62**(12): 1781-1789.
- Barnes, H. (1997). "Colibacillosis." Diseases of poultry: 131-141.

Basler, M., J. Masin, R. Osicka and P. Sebo (2006). "Pore-forming and enzymatic activities of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin synergize in promoting lysis of monocytes." Infection and immunity **74**(4): 2207-2214.

Bauchart, P., P. Germon, A. Brée, E. Oswald, J. Hacker and U. Dobrindt (2010). "Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli*—search for factors involved in host specificity or zoonotic potential." Microbial pathogenesis **49**(3): 105-115.

Bauche, C., A. Chenal, O. Knapp, C. Bodenreider, R. Benz, A. Chaffotte and D. Ladant (2006). "Structural and functional characterization of an essential RTX subdomain of *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin." Journal of Biological Chemistry **281**(25): 16914-16926.

Bauer, M. E. and R. A. Welch (1996). "Characterization of an RTX toxin from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7." Infection and immunity **64**(1): 167-175.

Benz, R., E. Maier, D. Ladant, A. Ullmann and P. Sebo (1994). "Adenylate cyclase toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis*. Evidence for the formation of small ion-permeable channels and comparison with HlyA of *Escherichia coli*." Journal of Biological Chemistry **269**(44): 27231-27239.

Bergthorsson, U. and H. Ochman (1998). "Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*." Molecular Biology and Evolution **15**(1): 6-16.

Bernheimer, A. W. (1988). [30] Assay of hemolytic toxins. Methods in enzymology, Elsevier. **165**: 213-217.

Berthoud, H., J. Frey and P. Kuhnert (2002). "Characterization of Aqx and its operon: the hemolytic RTX determinant of *Actinobacillus equuli*." Veterinary microbiology **87**(2): 159-174.

Bessaiah, H., P. Pokharel, H. Habouria, S. Houle and C. M. Dozois (2019). "yqhG Contributes to Oxidative Stress Resistance and Virulence of Uropathogenic *Escherichia coli* and Identification of Other Genes Altering Expression of Type 1 Fimbriae." Frontiers in cellular and infection microbiology **9**: 312.

Beutin, L., K. Gleier, I. Kontny, P. Echeverria and F. Scheutz (1997). "Origin and characteristics of enteroinvasive strains of *Escherichia coli* (EIEC) isolated in Germany." Epidemiology & Infection **118**(3): 199-205.

Bhakdi, S., S. Greulich, M. Muhly, B. Eberspächer, H. Becker, A. Thiele and F. Hugo (1989). "Potent leukocidal action of *Escherichia coli* hemolysin mediated by permeabilization of target cell membranes." Journal of Experimental Medicine **169**(3): 737-754.

Bielaszewska, M., T. Aldick, A. Bauwens and H. Karch (2014). "Hemolysin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*: structure, transport, biological activity and putative role in virulence." International Journal of Medical Microbiology **304**(5-6): 521-529.

Bielaszewska, M., C. Rüter, L. Kunsmann, L. Greune, A. Bauwens, W. Zhang, T. Kuczius, K. S. Kim, A. Mellmann and M. A. Schmidt (2013). "Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis." PLoS pathogens **9**(12): e1003797.

- Bien, J., O. Sokolova and P. Bozko (2012). "Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage." International journal of nephrology **2012**.
- Boardman, B. K. and K. J. F. Satchell (2004). "*Vibrio cholerae* strains with mutations in an atypical type I secretion system accumulate RTX toxin intracellularly." Journal of bacteriology **186**(23): 8137-8143.
- Bolotin, A., B. Quinquis, A. Sorokin and D. S. Ehrlich (2004). "Recent genetic transfer between *Lactococcus lactis* and *Enterobacteria*." Journal of bacteriology **186**(19): 6671-6677.
- Bretscher, M. S. (1992). "Circulating integrins: alpha 5 beta 1, alpha 6 beta 4 and Mac-1, but not alpha 3 beta 1, alpha 4 beta 1 or LFA-1." The EMBO journal **11**(2): 405-410.
- Brown, J., F. Leite and C. Czuprynski (1997). "Binding of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin to bovine leukocytes." Infection and immunity **65**(9): 3719-3724.
- Buchanan, S. K. (2001). "Type I secretion and multidrug efflux: transport through the TolC channel-tunnel." Trends in biochemical sciences **26**(1): 3-6.
- Busch, A. and G. Waksman (2012). "Chaperone-usher pathways: diversity and pilus assembly mechanism." Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **367**(1592): 1112-1122.
- Caza, M., F. Lépine and C. M. Dozois (2011). "Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*." Molecular microbiology **80**(1): 266-282.
- Caza, M., F. Lépine, S. Milot and C. M. Dozois (2008). "Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins." Infection and immunity **76**(8): 3539-3549.
- Chang, Y., R. Young and D. K. Struck (1991). "The *Actinobacillus pleuropneumoniae* hemolysin determinant: unlinked appCA and appBD loci flanked by pseudogenes." Journal of bacteriology **173**(16): 5151-5158.
- Chatterjee, R., S. Nag and K. Chaudhuri (2008). "Identification of a new RTX-like gene cluster in *Vibrio cholerae*." FEMS microbiology letters **284**(2): 165-171.
- Cheetham, B. F. and M. E. Katz (1995). "A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants." Molecular microbiology **18**(2): 201-208.
- Cherepanov, P. P. and W. Wackernagel (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.
- Chevance, F. F. and K. T. Hughes (2008). "Coordinating assembly of a bacterial macromolecular machine." Nature Reviews Microbiology **6**(6): 455.
- Clermont, O., J. K. Christenson, E. Denamur and D. M. Gordon (2013). "The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups." Environmental microbiology reports **5**(1): 58-65.

Clermont, O., M. Olier, C. Hoede, L. Diancourt, S. Brisse, M. Keroudean, J. Glodt, B. Picard, E. Oswald and E. Denamur (2011). "Animal and human pathogenic *Escherichia coli* strains share common genetic backgrounds." Infection, genetics and evolution **11**(3): 654-662.

Coote, J. (1992). "Structural and functional relationships among the RTX toxin determinants of gram-negative bacteria." FEMS microbiology reviews **8**(2): 137-161.

Cordero, C. L., D. S. Kudryashov, E. Reisler and K. J. F. Satchell (2006). "The actin cross-linking domain of the *Vibrio cholerae* RTX toxin directly catalyzes the covalent cross-linking of actin." Journal of Biological Chemistry **281**(43): 32366-32374.

Cortajarena, A. L., F. M. Goñi and H. Ostolaza (2002). "His-859 is an essential residue for the activity and pH dependence of *Escherichia coli* RTX toxin α -hemolysin." Journal of Biological Chemistry **277**(26): 23223-23229.

Cortajarena, A. L., F. M. Goñi and H. Ostolaza (2003). "Asp-863 is a key residue for calcium-dependent activity of *Escherichia coli* RTX toxin α -haemolysin." FEBS letters **546**(2-3): 271-275.

Crépin, S., J. Harel and C. M. Dozois (2012). "Chromosomal complementation using Tn7 transposon vectors in *Enterobacteriaceae*." Appl. Environ. Microbiol. **78**(17): 6001-6008.

Croxen, M. A. and B. B. Finlay (2010). "Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity." Nature Reviews Microbiology **8**(1): 26.

Cruz, J., F. Figueiredo, A. P. Matos, S. Duarte, A. Guerra and M. Ramalho (2019). "Infectious and Inflammatory Diseases of the Urinary Tract: Role of MR Imaging." Magnetic Resonance Imaging Clinics **27**(1): 59-75.

Cunha, M. P. V., A. B. Saidenberg, A. M. Moreno, A. J. P. Ferreira, M. A. M. Vieira, T. A. T. Gomes and T. Knöbl (2017). "Pandemic extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) clonal group O6-B2-ST73 as a cause of avian colibacillosis in Brazil." PloS one **12**(6): e0178970.

Cuthbertson, L., V. Kos and C. Whitfield (2010). "ABC transporters involved in export of cell surface glycoconjugates." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **74**(3): 341-362.

Dale, A. P. and N. Woodford (2015). "Extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC): disease, carriage and clones." Journal of Infection **71**(6): 615-626.

Datsenko, K. A. and B. L. Wanner (2000). "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products." Proceedings of the National Academy of Sciences **97**(12): 6640-6645.

Davidson, A. L. and H. Nikaido (1991). "Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*." Journal of Biological Chemistry **266**(14): 8946-8951.

de Lorenzo, V., M. Herrero and J. Neilands (1988). "IS1-mediated mobility of the aerobactin system of pColV-K30 in *Escherichia coli*." Molecular and General Genetics MGG **213**(2-3): 487-490.

Delepelaire, P. (2004). "Type I secretion in gram-negative bacteria." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1694**(1-3): 149-161.

Dhakal, B., R. Kulesus and M. Mulvey (2008). "Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*." European journal of clinical investigation **38**: 2-11.

Dhakal, B. K. and M. A. Mulvey (2012). "The UPEC pore-forming toxin α -hemolysin triggers proteolysis of host proteins to disrupt cell adhesion, inflammatory, and survival pathways." Cell host & microbe **11**(1): 58-69.

Dho-Moulin, M. and J. M. Fairbrother (1999). "Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)." Veterinary research **30**(2-3): 299-316.

Dileepan, T., S. Kachlany, N. Balashova, J. Patel and S. Maheswaran (2007). "Human CD18 is the functional receptor for *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin." Infection and immunity **75**(10): 4851-4856.

Dozois, C. M., F. Daigle and R. Curtiss (2003). "Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain." Proceedings of the National Academy of Sciences **100**(1): 247-252.

Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels and R. Curtiss (2000). "Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region." Infection and immunity **68**(7): 4145-4154.

Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel and M. Bossé (1992). "pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys." Infection and Immunity **60**(7): 2648-2656.

Dutta, P. R., R. Cappello, F. Navarro-García and J. P. Nataro (2002). "Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*." Infection and immunity **70**(12): 7105-7113.

Dziva, F., H. Hauser, T. R. Connor, P. M. van Diemen, G. Prescott, G. C. Langridge, S. Eckert, R. R. Chaudhuri, C. Ewers and M. Mellata (2013). "Sequencing and functional annotation of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O78 strains reveal the evolution of *E. coli* lineages pathogenic for poultry via distinct mechanisms." Infection and immunity **81**(3): 838-849.

Dziva, F. and M. P. Stevens (2008). "Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts." Avian Pathology **37**(4): 355-366.

Engstrom, M. D. (2016). "Regulation of the Uropathogenic *Escherichia coli* tos Operon and Its Implications for an Expansion of Microbial Reciprocal Regulation Between Adherence-and Motility-Related Genes."

Evans Jr, D. J. and D. G. Evans (1996). "*Escherichia coli* in diarrheal disease."

Ewers, C., T. Janßen, S. Kießling, H.-C. Philipp and L. H. Wieler (2004). "Molecular epidemiology of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) isolated from colisepticemia in poultry." Veterinary microbiology **104**(1-2): 91-101.

Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kießling, K. Alt, E.-M. Antão, C. Laturnus, I. Diehl, S. Glodde and T. Homeier (2007). "Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing

Escherichia coli: how closely related are they?" International Journal of Medical Microbiology **297**(3): 163-176.

Fabbri, A., S. Travaglione and C. Fiorentini (2010). "*Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1): toxin biology, in vivo applications and therapeutic potential." Toxins **2**(2): 283-296.

Felmlee, T., S. Pellett and R. A. Welch (1985). "Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin." Journal of bacteriology **163**(1): 94-105.

Ficken, M. and H. Barnes (1989). "Acute airsacculitis in turkeys inoculated with *Pasteurella multocida*." Veterinary pathology **26**(3): 231-237.

Fine, D. H., J. B. Kaplan, S. C. Kachlany and H. C. Schreiner (2006). "How we got attached to *Actinobacillus actinomycetemcomitans*: a model for infectious diseases." Periodontology **2000** **42**(1): 114-157.

Fiorentini, C., A. Fabbri, G. Flatau, G. Donelli, P. Matarrese, E. Lemichez, L. Falzano and P. Boquet (1997). "*Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase." Journal of Biological Chemistry **272**(31): 19532-19537.

Fischbach, M. A., H. Lin, D. R. Liu and C. T. Walsh (2006). "How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron." Nature chemical biology **2**(3): 132.

Foxman, B. (2002). "Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs." The American journal of medicine **113**(1): 5-13.

Frey, J. (2011). "The role of RTX toxins in host specificity of animal pathogenic *Pasteurellaceae*." Veterinary microbiology **153**(1-2): 51-58.

Frey, J. (2019). "RTX Toxins of Animal Pathogens and Their Role as Antigens in Vaccines and Diagnostics." Toxins **11**(12): 719.

Frey, J. and P. Kuhnert (2002). "RTX toxins in *Pasteurellaceae*." International journal of medical microbiology **292**(3-4): 149-158.

Frey, J., R. Meier, D. Gygi and J. Nicolet (1991). "Nucleotide sequence of the hemolysin I gene from *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Infection and immunity **59**(9): 3026-3032.

Gadeberg, O., I. Orskov and J. M. Rhodes (1983). "Cytotoxic effect of an alpha-hemolytic *Escherichia coli* strain on human blood monocytes and granulocytes in vitro." Infection and immunity **41**(1): 358-364.

Goebel, W. and J. Hedgpeth (1982). "Cloning and functional characterization of the plasmid-encoded hemolysin determinant of *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **151**(3): 1290-1298.

Gross, W. (1991). "Colibacillosis, p 138–144." Diseases of poultry, 9th ed. Iowa State University Press, Ames, IA.

Gross, W. (1994). "Diseases due to *Escherichia coli* in poultry."

Guabiraba, R. and C. Schouler (2015). "Avian colibacillosis: still many black holes." FEMS microbiology letters **362**(15): fmv118.

Guyer, D. M., I. R. Henderson, J. P. Nataro and H. L. Mobley (2000). "Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*." Molecular microbiology **38**(1): 53-66.

Guyer, D. M., S. Radulovic, F.-E. Jones and H. L. Mobley (2002). "Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells." Infection and immunity **70**(8): 4539-4546.

Guyomard-Rabenirina, S., J. Malespine, C. Ducat, S. Sadikalay, M. Falord, D. Harrois, V. Richard, C. Dozois, S. Breurec and A. Talarmin (2016). "Temporal trends and risks factors for antimicrobial resistant *Enterobacteriaceae* urinary isolates from outpatients in Guadeloupe." BMC microbiology **16**(1): 121.

Gyles, C. L. (1994). *Escherichia coli* in domestic animals and humans, CAB international.

Habouria, H., P. Pokharel, S. Maris, A. Garénaux, H. Bessaiah, S. Houle, F. J. Veyrier, S. Guyomard-Rabenirina, A. Talarmin and C. M. Dozois (2019). "Three new serine-protease autotransporters of *Enterobacteriaceae* (SPATEs) from extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli* and combined role of SPATEs for cytotoxicity and colonization of the mouse kidney." Virulence **10**(1): 568-587.

Hacker, J. (1992). "Role of fimbrial adhesins in the pathogenesis of *Escherichia coli* infections." Canadian journal of microbiology **38**(7): 720-727.

Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Mühldorfer and H. Tschäpe (1997). "Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution." Molecular microbiology **23**(6): 1089-1097.

Hacker, J. and J. B. Kaper (2000). "Pathogenicity islands and the evolution of microbes." Annual Reviews in Microbiology **54**(1): 641-679.

Hackett, M., C. B. Walker, L. Guo, M. C. Gray, S. Van Cuyk, A. Ullmann, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, E. L. Hewlett and P. Sebo (1995). "Hemolytic, but not cell-invasive activity, of adenylate cyclase toxin is selectively affected by differential fatty-acylation in *Escherichia coli*." Journal of Biological Chemistry **270**(35): 20250-20253.

Hamrick, T. S., S. L. Harris, P. A. Spears, E. A. Havell, J. R. Horton, P. W. Russell and P. E. Orndorff (2000). "Genetic characterization of *Escherichia coli* type 1 pilus adhesin mutants and identification of a novel binding phenotype." Journal of bacteriology **182**(14): 4012-4021.

Harshman, S., N. Sugg and P. Cassidy (1988). [1] Preparation and purification of staphylococcal alpha toxin. Methods in enzymology, Elsevier. **165**: 3-7.

Heimer, S. R., D. A. Rasko, C. V. Lockett, D. E. Johnson and H. L. Mobley (2004). "Autotransporter genes pic and tsh are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection." Infection and immunity **72**(1): 593-597.

Heinemann, J. A. and R. A. Bungard (2006). "Horizontal gene transfer." Reviews in Cell Biology and Molecular Medicine.

- Henderson, B., S. P. Nair, J. M. Ward and M. Wilson (2003). "Molecular pathogenicity of the oral opportunistic pathogen *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Annual Reviews in Microbiology **57**(1): 29-55.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez and D. Ala'Aldeen (2004). "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **68**(4): 692-744.
- Herlax, V., S. Maté, O. Rimoldi and L. Bakás (2009). "Relevance of fatty acid covalently bound to *Escherichia coli* α -hemolysin and membrane microdomains in the oligomerization process." Journal of Biological Chemistry **284**(37): 25199-25210.
- Higgins, C. F., I. D. Hiles, G. P. Salmond, D. R. Gill, J. A. Downie, I. J. Evans, I. B. Holland, L. Gray, S. D. Buckel and A. W. Bell (1986). "A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria." Nature **323**(6087): 448.
- Highlander, S. K., M. CHIDAMBARAM, M. J. ENGLER and G. M. WEINSTOCK (1989). "DNA sequence of the *Pasteurella haemolytica* leukotoxin gene cluster." DNA **8**(1): 15-28.
- Holland, I. B. (2004). "Translocation of bacterial proteins—an overview." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1694**(1-3): 5-16.
- Honko, A. N. and S. B. Mizel (2005). "Effects of flagellin on innate and adaptive immunity." Immunologic research **33**(1): 83-101.
- Horne, S. M., S. J. Pfaff-McDonough, C. W. Giddings and L. K. Nolan (2000). "Cloning and sequencing of the *iss* gene from a virulent avian *Escherichia coli*." Avian Diseases: 179-184.
- Hotz, C. (2008). "Improvement of *Salmonella* vaccine strains for cancer immune therapy based on secretion or surface display of antigens."
- Iwase, M., E. Lally, P. Berthold, H. Korchak and N. Taichman (1990). "Effects of cations and osmotic protectants on cytolytic activity of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin." Infection and immunity **58**(6): 1782-1788.
- Jeong, H., V. Barbe, C. H. Lee, D. Vallenet, D. S. Yu, S.-H. Choi, A. Couloux, S.-W. Lee, S. H. Yoon and L. Cattolico (2009). "Genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3)." Journal of molecular biology **394**(4): 644-652.
- Jeyaseelan, S., S. Sreevatsan and S. K. Maheswaran (2002). "Role of *Mannheimia haemolytica* leukotoxin in the pathogenesis of bovine pneumonic pasteurellosis." Animal Health Research Reviews **3**(2): 69-82.
- Johnson, J. R. (1991). "Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection." Clinical microbiology reviews **4**(1): 80-128.
- Johnson, J. R. and T. A. Russo (2002). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli"." Journal of Laboratory and Clinical Medicine **139**(3): 155-162.
- Johnson, T. J., S. J. Johnson and L. K. Nolan (2006). "Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids." Journal of bacteriology **188**(16): 5975-5983.

Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, J. A. Skyberg, A. M. Lynne, J. R. Johnson and L. K. Nolan (2007). "The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1: K1: H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes." Journal of bacteriology **189**(8): 3228-3236.

Johnson, T. J. and L. K. Nolan (2009). "Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **73**(4): 750-774.

Kammler, M., C. Schön and K. Hantke (1993). "Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **175**(19): 6212-6219.

Kanonenberg, K., C. K. Schwarz and L. Schmitt (2013). "Type I secretion systems—a story of appendices." Research in microbiology **164**(6): 596-604.

Kaper, J. B., J. P. Nataro and H. L. Mobley (2004). "Pathogenic *Escherichia coli*." Nature reviews microbiology **2**(2): 123.

Karch, H., P. I. Tarr and M. Bielaszewska (2005). "Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in human medicine." International journal of medical microbiology **295**(6-7): 405-418.

Kato, S., Y. Kowashi and D. R. Demuth (2002). "Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycescomitans* are enriched in leukotoxin." Microbial pathogenesis **32**(1): 1-13.

Kesty, N. C., K. M. Mason, M. Reedy, S. E. Miller and M. J. Kuehn (2004). "Enterotoxigenic *Escherichia coli* vesicles target toxin delivery into mammalian cells." The EMBO journal **23**(23): 4538-4549.

Kim, B. S., H. E. Gavin and K. J. Satchell (2015). "Distinct roles of the repeat-containing regions and effector domains of the *Vibrio vulnificus* multifunctional-autoprocessing repeats-in-toxin (MARTX) toxin." MBio **6**(2): e00324-00315.

Kim, K. S. (2003). "Neurological diseases: Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury." Nature Reviews Neuroscience **4**(5): 376.

Knapp, O. and R. Benz (2020). "Membrane Activity and Channel Formation of the Adenylate Cyclase Toxin (CyaA) of *Bordetella pertussis* in Lipid Bilayer Membranes." Toxins **12**(3): 169.

Knutton, S., T. Baldwin, P. Williams, A. Manjarrez-Hernandez and A. Aitken (1993). "The attaching and effacing virulence property of enteropathogenic *Escherichia coli*." Zentralblatt für Bakteriologie **278**(2-3): 209-217.

Kobayashi, R. K., L. C. J. Gaziri and M. C. Vidotto (2010). "Functional activities of the Tsh protein from avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strains." Journal of veterinary science **11**(4): 315-319.

Kobisch, M. and J. Van den Bosch (1992). Efficacy of an *Actinobacillus pleuropneumoniae* subunit vaccine. Proceedings of the International Pig Veterinary Society Congress, The Hague, The Netherlands.

Koebnik, R., K. P. Locher and P. Van Gelder (2000). "Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell." Molecular microbiology **37**(2): 239-253.

Kolodrubetz, D., T. Dailey, J. Ebersole and E. Kraig (1989). "Cloning and expression of the leukotoxin gene from *Actinobacillus actinomycetemcomitans*." Infection and immunity **57**(5): 1465-1469.

Koronakis, V., J. Eswaran and C. Hughes (2004). "Structure and function of TolC: the bacterial exit duct for proteins and drugs." Annual review of biochemistry **73**(1): 467-489.

Koronakis, V., J. Li, E. Koronakis and K. Stauffer (1997). "Structure of TolC, the outer membrane component of the bacterial type I efflux system, derived from two-dimensional crystals." Molecular microbiology **23**(3): 617-626.

Korostoff, J., J. F. Wang, I. Kieba, M. Miller, B. J. Shenker and E. T. Lally (1998). "*Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin induces apoptosis in HL-60 cells." Infection and immunity **66**(9): 4474-4483.

Kosek, M., C. Bern and R. L. Guerrant (2003). "The global burden of diarrhoeal disease, as estimated from studies published between 1992 and 2000." Bulletin of the world health organization **81**: 197-204.

Krishnan, S., A. C. Chang, J. Hodges, P.-O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler, B. A. Nicholson, L. K. Nolan and N. V. Prasadarao (2015). "Serotype O18 avian pathogenic and neonatal meningitis *Escherichia coli* strains employ similar pathogenic strategies for the onset of meningitis." Virulence **6**(8): 777-786.

Kroemer, G., B. Dallaporta and M. Resche-Rigon (1998). "The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis." Annual review of physiology **60**(1): 619-642.

Kuhnert, P. and H. Christensen (2008). Pasteurellaceae: biology, genomics and molecular aspects, Horizon Scientific Press.

Kuhnert, P., B. Heyberger-Meyer, A. P. Burnens, J. Nicolet and J. Frey (1997). "Detection of RTX toxin genes in gram-negative bacteria with a set of specific probes." Appl. Environ. Microbiol. **63**(6): 2258-2265.

Kuhnert, P., E. Scholten, S. Haefner, D. Mayor and J. Frey (2010). "*Basfia succiniciproducens* gen. nov., sp. nov., a new member of the family *Pasteurellaceae* isolated from bovine rumen." International journal of systematic and evolutionary microbiology **60**(1): 44-50.

Kurien, B. T. and R. H. Scofield (2006). "Western blotting." Methods **38**(4): 283-293.

La Ragione, R. and M. J. Woodward (2002). "Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia." Research in veterinary science **73**(1): 27-35.

Lally, E. T., R. B. Hill, I. R. Kieba and J. Korostoff (1999). "The interaction between RTX toxins and target cells." Trends in microbiology **7**(9): 356-361.

Lally, E. T., I. R. Kieba, A. Sato, C. L. Green, J. Rosenbloom, J. Korostoff, J. F. Wang, B. J. Shenker, S. Orllepp and M. K. Robinson (1997). "RTX toxins recognize a $\beta 2$ integrin on the surface of human target cells." Journal of Biological Chemistry **272**(48): 30463-30469.

Lane, M. C., C. J. Alteri, S. N. Smith and H. L. Mobley (2007). "Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract." Proceedings of the National Academy of Sciences **104**(42): 16669-16674.

Lee, J. H., M. W. Kim, B. S. Kim, S. M. Kim, B. C. Lee, T. S. Kim and S. H. Choi (2007). "Identification and characterization of the *Vibrio vulnificus* rtxA essential for cytotoxicity in vitro and virulence in mice." The Journal of Microbiology **45**(2): 146-152.

Lee, M., S.-Y. Jun, B.-Y. Yoon, S. Song, K. Lee and N.-C. Ha (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.

Lemichez, E., G. Flatau, M. Bruzzone, P. Boquet and M. Gauthier (1997). "Molecular localization of the *Escherichia coli* cytotoxic necrotizing factor CNF1 cell-binding and catalytic domains." Molecular microbiology **24**(5): 1061-1070.

Lemonnier, M., L. Landraud and E. Lemichez (2007). "Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology." FEMS microbiology reviews **31**(5): 515-534.

Léveillé, S., M. Caza, J. R. Johnson, C. Clabots, M. Sabri and C. M. Dozois (2006). "Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor." Infection and immunity **74**(6): 3427-3436.

Li, L., J. L. Rock and D. R. Nelson (2008). "Identification and characterization of a repeat-in-toxin gene cluster in *Vibrio anguillarum*." Infection and immunity **76**(6): 2620-2632.

Liévin-Le Moal, V., Y. Comenge, V. Ruby, R. Amsellem, V. Nicolas and A. L. Servin (2011). "Secreted autotransporter toxin (Sat) triggers autophagy in epithelial cells that relies on cell detachment." Cellular microbiology **13**(7): 992-1013.

Lin, W., K. J. Fullner, R. Clayton, J. A. Sexton, M. B. Rogers, K. E. Calia, S. B. Calderwood, C. Fraser and J. J. Mekalanos (1999). "Identification of a *Vibrio cholerae* RTX toxin gene cluster that is tightly linked to the cholera toxin prophage." Proceedings of the National Academy of Sciences **96**(3): 1071-1076.

Linhartová, I., L. Bumba, J. Mašín, M. Basler, R. Osička, J. Kamanová, K. Procházková, I. Adkins, J. Hejnová-Holubová and L. Sadílková (2010). "RTX proteins: a highly diverse family secreted by a common mechanism." FEMS microbiology reviews **34**(6): 1076-1112.

Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method." methods **25**(4): 402-408.

Lloyd, A. L., T. A. Henderson, P. D. Vigil and H. L. Mobley (2009). "Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence." Journal of bacteriology **191**(11): 3469-3481.

Lo, R., C. Strathdee and P. Shewen (1987). "Nucleotide sequence of the leukotoxin genes of *Pasteurella haemolytica* A1." Infection and Immunity **55**(9).

- MacDonald, J. and A. N. Rycroft (1992). "Molecular cloning and expression of ptxA, the gene encoding the 120-kilodalton cytotoxin of *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 2." Infection and immunity **60**(7): 2726-2732.
- Macnab, R. M. (2003). "How bacteria assemble flagella." Annual Reviews in Microbiology **57**(1): 77-100.
- Mahillon, J., C. Léonard and M. Chandler (1999). "IS elements as constituents of bacterial genomes." Research in microbiology **150**(9-10): 675-687.
- Mahmood, T. and P.-C. Yang (2012). "Western blot: technique, theory, and trouble shooting." North American journal of medical sciences **4**(9): 429.
- Mangan, D. F., N. Taichman, E. Lally and S. Wahl (1991). "Lethal effects of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin on human T lymphocytes." Infection and immunity **59**(9): 3267-3272.
- Marc, D., P. Arné, A. Brée and M. Dho-Moulin (1998). "Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*." Research in microbiology **149**(7): 473-485.
- Marc, D. and M. Dho-Moulin (1996). "Analysis of the fim cluster of an avian O2 strain of *Escherichia coli*: serogroup-specific sites within fimA and nucleotide sequence of fimI." Journal of medical microbiology **44**(6): 444-452.
- Maroncle, N. M., K. E. Sivick, R. Brady, F.-E. Stokes and H. L. Mobley (2006). "Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*." Infection and immunity **74**(11): 6124-6134.
- Marrs, C. F., L. Zhang and B. Foxman (2005). "*Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?" FEMS microbiology letters **252**(2): 183-190.
- Martínez, J. A., S. Soto, A. Fabrega, M. Almela, J. Mensa, A. Soriano, F. Marco, M. T. J. de Anta and J. Vila (2006). "Relationship of phylogenetic background, biofilm production, and time to detection of growth in blood culture vials with clinical variables and prognosis associated with *Escherichia coli* bacteremia." Journal of clinical microbiology **44**(4): 1468-1474.
- Mathewson, J. J., Z. D. Jiang, A. Zumla, C. Chintu, N. Luo, S. R. Calamari, R. M. Genta, A. Steephen, P. Schwartz and H. L. DuPont (1995). "HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* in patients with human immunodeficiency virus-associated diarrhea." Journal of Infectious Diseases **171**(6): 1636-1639.
- McBean, M. and S. Rajamani (2001). "Increasing rates of hospitalization due to septicemia in the US elderly population, 1986-1997." The Journal of infectious diseases **183**(4): 596-603.
- McBroom, A. and M. Kuehn (2005). "Outer Membrane Vesicles." EcoSal Plus **1**(2).
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss III, P. K. Brown, P. Arné, A. Brée, C. Desautels and J. M. Fairbrother (2003). "Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity." Infection and Immunity **71**(1): 536-540.

- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss III, B. Lehoux and J. M. Fairbrother (2003). "Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages." Infection and immunity **71**(1): 494-503.
- Michelacci, V., G. Prosseda, A. Maugliani, R. Tozzoli, S. Sanchez, S. Herrera-León, T. Dallman, C. Jenkins, A. Caprioli and S. Morabito (2016). "Characterization of an emergent clone of enteroinvasive *Escherichia coli* circulating in Europe." Clinical Microbiology and Infection **22**(3): 287. e211-287. e219.
- Miethke, M. (2013). "Molecular strategies of microbial iron assimilation: from high-affinity complexes to cofactor assembly systems." Metallomics **5**(1): 15-28.
- Mol, O. and B. Oudega (1996). "Molecular and structural aspects of fimbriae biosynthesis and assembly in *Escherichia coli*." FEMS microbiology reviews **19**(1): 25-52.
- Morova, J., R. Osicka, J. Masin and P. Sebo (2008). "RTX cytotoxins recognize β 2 integrin receptors through N-linked oligosaccharides." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(14): 5355-5360.
- Mulvey, M. A., Y. S. Lopez-Boado, C. L. Wilson, R. Roth, W. C. Parks, J. Heuser and S. J. Hultgren (1998). "Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*." Science **282**(5393): 1494-1497.
- Murase, K., P. Martin, G. Porcheron, S. Houle, E. Helloin, M. Pénary, J.-P. Nougayrède, C. M. Dozois, T. Hayashi and E. Oswald (2015). "HlyF produced by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a virulence factor that regulates outer membrane vesicle biogenesis." The Journal of infectious diseases **213**(5): 856-865.
- Muto, A. and S. Osawa (1987). "The guanine and cytosine content of genomic DNA and bacterial evolution." Proceedings of the National Academy of Sciences **84**(1): 166-169.
- NAGAHATA, H. (2004). "Bovine leukocyte adhesion deficiency (BLAD): a review." Journal of Veterinary Medical Science **66**(12): 1475-1482.
- Nagamatsu, K., T. J. Hannan, R. L. Guest, M. Kostakioti, M. Hadjifrangiskou, J. Binkley, K. Dodson, T. L. Raivio and S. J. Hultgren (2015). "Dysregulation of *Escherichia coli* α -hemolysin expression alters the course of acute and persistent urinary tract infection." Proceedings of the National Academy of Sciences **112**(8): E871-E880.
- Nakamura, Y., N. Yamamoto, Y. Kino, N. Yamamoto, S. Kamei, H. Mori, K. Kurokawa and N. Nakashima (2016). "Establishment of a multi-species biofilm model and metatranscriptomic analysis of biofilm and planktonic cell communities." Applied microbiology and biotechnology **100**(16): 7263-7279.
- Nataro, J. P. and J. B. Kaper (1998). "Diarrheagenic *Escherichia coli*." Clinical microbiology reviews **11**(1): 142-201.
- O'brien, I. and F. Gibson (1970). "The structure of enterochelin and related 2, 3-dihydroxy-N-benzoyne conjugates from *Escherichia coli*." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects **215**(2): 393-402.

Ochman, H., J. G. Lawrence and E. A. Groisman (2000). "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation." nature **405**(6784): 299.

Ochoa, T. J. and C. A. Contreras (2011). "Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children." Current opinion in infectious diseases **24**(5): 478.

Ohta, H., H. Hara, K. Fukui, H. Kurihara, Y. Murayama and K. Kato (1993). "Association of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* leukotoxin with nucleic acids on the bacterial cell surface." Infection and immunity **61**(11): 4878-4884.

Okhuysen, P. C. and H. L. DuPont (2010). *Enteroaggregative Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance, The University of Chicago Press.

Opal, S. M., A. S. Cross, P. Gemski and L. W. Lyhte (1990). "Aerobactin and α -hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool." Journal of Infectious Diseases **161**(4): 794-796.

Osička, R., K. Procházková, M. Šulc, I. Linhartová, V. Havlíček and P. Šebo (2004). "A Novel "Clip-and-link" Activity of Repeat in Toxin (RTX) Proteins from Gram-negative Pathogens COVALENT PROTEIN CROSS-LINKING BY AN ASP-LYS ISOPEPTIDE BOND UPON CALCIUM-DEPENDENT PROCESSING AT AN ASP-PRO BOND." Journal of Biological Chemistry **279**(24): 24944-24956.

Ostolaza, H. (1995). "Interaction of the bacterial protein toxin α -haemolysin with model membranes: protein binding does not always lead to lytic activity." FEBS letters **371**(3): 303-306.

Ostolaza, H., B. Bartolomé, I. O. de Zárate, F. de la Cruz and F. M. Goñi (1993). "Release of lipid vesicle contents by the bacterial protein toxin α -haemolysin." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes **1147**(1): 81-88.

Otto, B. R., S. J. Van Dooren, C. M. Dozois, J. Luirink and B. Oudega (2002). "*Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*." Infection and immunity **70**(1): 5-10.

Parreira, V., C. Arns and T. Yano (1998). "Virulence factors of avian *Escherichia coli* associated with swollen head syndrome." Avian Pathology **27**(2): 148-154.

Parreira, V. and C. Gyles (2003). "A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin." Infection and immunity **71**(9): 5087-5096.

Pattison, M., N. Chettle, C. Randall and P. Wyeth (1989). "Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens." The Veterinary Record **125**(9): 229-231.

Pellett, S. and R. A. Welch (1996). "*Escherichia coli* hemolysin mutants with altered target cell specificity." Infection and immunity **64**(8): 3081-3087.

Perego, M., C. Higgins, S. Pearce, M. Gallagher and J. Hoch (1991). "The oligopeptide transport system of *Bacillus subtilis* plays a role in the initiation of sporulation." Molecular microbiology **5**(1): 173-185.

Pitout, J. (2012). "Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: a combination of virulence with antibiotic resistance." Frontiers in microbiology **3**: 9.

Porcheron, G., A. Garénaux, J. Proulx, M. Sabri and C. M. Dozois (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.

Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Brée, C. Desautels, B. Martineau-Doize and J. M. Fairbrother (1997). "Localization of their vivoexpression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*." Microbial pathogenesis **22**(6): 331-341.

Pratt, L. A. and R. Kolter (1998). "Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili." Molecular microbiology **30**(2): 285-293.

Ratner, A. J., K. R. Hippe, J. L. Aguilar, M. H. Bender, A. L. Nelson and J. N. Weiser (2006). "Epithelial cells are sensitive detectors of bacterial pore-forming toxins." Journal of Biological Chemistry **281**(18): 12994-12998.

Restieri, C., G. Garriss, M.-C. Locas and C. M. Dozois (2007). "Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains." Appl. Environ. Microbiol. **73**(5): 1553-1562.

Ristow, L. C., V. Tran, K. J. Schwartz, L. Pankratz, A. Mehle, J.-D. Sauer and R. A. Welch (2019). "The Extracellular Domain of the β 2 Integrin β Subunit (CD18) Is Sufficient for *Escherichia coli* Hemolysin and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* Leukotoxin Cytotoxic Activity." mBio **10**(4): e01459-01419.

Rivera, M. C., R. Jain, J. E. Moore and J. A. Lake (1998). "Genomic evidence for two functionally distinct gene classes." Proceedings of the National Academy of Sciences **95**(11): 6239-6244.

Roberts, J. A., B.-I. Marklund, D. Ilver, D. Haslam, M. B. Kaack, G. Baskin, M. Louis, R. Möllby, J. Winberg and S. Normark (1994). "The Gal (alpha 1-4) Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract." Proceedings of the National Academy of Sciences **91**(25): 11889-11893.

Roy, S., K. Thanasekaran, A. R. Dutta Roy and S. C. Sehgal (2006). "Distribution of *Shigella* enterotoxin genes and secreted autotransporter toxin gene among diverse species and serotypes of *Shigella* isolated from Andaman Islands, India." Tropical Medicine & International Health **11**(11): 1694-1698.

Ruiz-Perez, F. and J. P. Nataro (2014). "Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence." Cellular and molecular life sciences **71**(5): 745-770.

Ruiz-Perez, F., R. Wahid, C. S. Faherty, K. Kolappaswamy, L. Rodriguez, A. Santiago, E. Murphy, A. Cross, M. B. Sztein and J. P. Nataro (2011). "Serine protease autotransporters from *Shigella flexneri* and pathogenic *Escherichia coli* target a broad range of leukocyte glycoproteins." Proceedings of the National Academy of Sciences **108**(31): 12881-12886.

Saint, N., K.-L. Lou, C. Widmer, M. Luckey, T. Schirmer and J. P. Rosenbusch (1996). "Structural and functional characterization of OmpF porin mutants selected for larger pore size II. Functional characterization." Journal of Biological Chemistry **271**(34): 20676-20680.

Saitou, N. and M. Nei (1987). "The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees." Molecular biology and evolution **4**(4): 406-425.

Satchell, K. J., C. J. Jones, J. Wong, J. Queen, S. Agarwal and F. H. Yildiz (2016). "Phenotypic analysis reveals that the 2010 Haiti cholera epidemic is linked to a hypervirulent strain." Infection and immunity **84**(9): 2473-2481.

Satchell, K. J. F. (2007). "MARTX, multifunctional autoprocessing repeats-in-toxin toxins." Infection and immunity **75**(11): 5079-5084.

Schaller, A., R. Kuhn, P. Kuhnert, J. Nicolet, T. J. Anderson, J. I. MacInnes, R. P. Segers and J. Frey (1999). "Characterization of apxIVA, a new RTX determinant of *Actinobacillus pleuropneumoniae*." Microbiology **145**(8): 2105-2116.

Schembri, M. A., K. Kjaergaard, E. V. Sokurenko and P. Klemm (2001). "Molecular characterization of the *Escherichia coli* FimH adhesin." The Journal of infectious diseases **183**(Supplement_1): S28-S31.

Schmidt, H., L. Beutin and H. Karch (1995). "Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157: H7 strain EDL 933." Infection and immunity **63**(3): 1055-1061.

Schmidt, H. and M. Hensel (2004). "Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis." Clinical microbiology reviews **17**(1): 14-56.

Schneider, D. and R. E. Lenski (2004). "Dynamics of insertion sequence elements during experimental evolution of bacteria." Research in Microbiology **155**(5): 319-327.

Šebo, P. and D. Ladant (1993). "Repeat sequences in the *Bordetella pertussis* adenylate cyclase toxin can be recognized as alternative carboxy-proximal secretion signals by the *Escherichia coli*-haemolysin translocator." Molecular microbiology **9**(5): 999-1009.

Siguié, P., J. Filée and M. Chandler (2006). "Insertion sequences in prokaryotic genomes." Current opinion in microbiology **9**(5): 526-531.

Sperandio, V. and Y. Nguyen (2012). "Enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) pathogenesis." Frontiers in cellular and infection microbiology **2**: 90.

Stamm, W. E. (1982). "Recent developments in the diagnosis and treatment of urinary tract infections." Western Journal of Medicine **137**(3): 213.

Stanley, P., V. Koronakis and C. Hughes (1998). "Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function." Microbiol. Mol. Biol. Rev. **62**(2): 309-333.

Stanley, P., L. C. Packman, V. Koronakis and C. Hughes (1994). "Fatty acylation of two internal lysine residues required for the toxic activity of *Escherichia coli* hemolysin." Science **266**(5193): 1992-1996.

- Stathopoulos, C., D. L. Provenge and R. Curtiss (1999). "Characterization of the Avian Pathogenic *Escherichia coli* Hemagglutinin Tsh, a Member of the Immunoglobulin A Protease-Type Family of Autotransporters." Infection and immunity **67**(2): 772-781.
- Studier, F. W., P. Daegelen, R. E. Lenski, S. Maslov and J. F. Kim (2009). "Understanding the differences between genome sequences of *Escherichia coli* B strains REL606 and BL21 (DE3) and comparison of the *E. coli* B and K-12 genomes." Journal of molecular biology **394**(4): 653-680.
- Symmons, M. F., E. Bokma, E. Koronakis, C. Hughes and V. Koronakis (2009). "The assembled structure of a complete tripartite bacterial multidrug efflux pump." Proceedings of the National Academy of Sciences **106**(17): 7173-7178.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski and S. Kumar (2013). "MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0." Molecular biology and evolution **30**(12): 2725-2729.
- Taneike, I., H.-M. Zhang, N. Wakisaka-Saito and T. Yamamoto (2002). "Enterohemolysin operon of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: a virulence function of inflammatory cytokine production from human monocytes." FEBS letters **524**(1-3): 219-224.
- Tang, M., K. Quanstrom, C. Jin and A. M. Suskind (2019). "Recurrent Urinary Tract Infections are Associated With Frailty in Older Adults." Urology **123**: 24-27.
- Terlizzi, M. E., G. Gribaudo and M. E. Maffei (2017). "UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) infections: virulence factors, bladder responses, antibiotic, and non-antibiotic antimicrobial strategies." Frontiers in microbiology **8**: 1566.
- Thankavel, K., B. Madison, T. Ikeda, R. Malaviya, A. H. Shah, P. M. Arumugam and S. N. Abraham (1997). "Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection." The Journal of clinical investigation **100**(5): 1123-1136.
- Thomas, C. M. and K. M. Nielsen (2005). "Mechanisms of, and barriers to, horizontal gene transfer between bacteria." Nature reviews microbiology **3**(9): 711.
- Thomas, S., I. B. Holland and L. Schmitt (2014). "The type 1 secretion pathway—the hemolysin system and beyond." Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research **1843**(8): 1629-1641.
- Thumbikat, P., R. Briggs, M. S. Kannan and S. Maheswaran (2003). "Biological effects of two genetically defined leukotoxin mutants of *Mannheimia haemolytica*." Microbial pathogenesis **34**(5): 217-226.
- Ulett, G. C., J. Valle, C. Beloin, O. Sherlock, J.-M. Ghigo and M. A. Schembri (2007). "Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract." Infection and immunity **75**(7): 3233-3244.
- Valeva, A., I. Siegel, M. Wylenzek, T. M. Wassenaar, S. Weis, N. Heinz, R. Schmitt, C. Fischer, R. Reinartz and S. Bhakdi (2008). "Putative identification of an amphipathic α -helical sequence in hemolysin of *Escherichia coli* (HlyA) involved in transmembrane pore formation." Biological chemistry **389**(9): 1201-1207.

- Valeva, A., I. Walev, H. Kemmer, S. Weis, I. Siegel, F. Boukhallouk, T. M. Wassenaar, T. Chavakis and S. Bhakdi (2005). "Binding of *Escherichia coli* hemolysin and activation of the target cells is not receptor-dependent." Journal of Biological Chemistry **280**(44): 36657-36663.
- Valle, J., A. N. Mabbett, G. C. Ulett, A. Toledo-Arana, K. Wecker, M. Totsika, M. A. Schembri, J.-M. Ghigo and C. Beloin (2008). "UpaG, a new member of the trimeric autotransporter family of adhesins in uropathogenic *Escherichia coli*." Journal of bacteriology **190**(12): 4147-4161.
- Van den Eede, G., H. Aarts, H.-J. Buhk, G. Corthier, H. J. Flint, W. Hammes, B. Jacobsen, T. Midtvedt, J. Van der Vossen and A. von Wright (2004). "The relevance of gene transfer to the safety of food and feed derived from genetically modified (GM) plants." Food and Chemical Toxicology **42**(7): 1127-1156.
- Vega, B. A., B. A. Belinka Jr and S. C. Kachlany (2019). "*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* leukotoxin (LtxA; leukothera®): Mechanisms of action and therapeutic applications." Toxins **11**(9): 489.
- Vigil, P. D., A. E. Stapleton, J. R. Johnson, T. M. Hooton, A. P. Hodges, Y. He and H. L. Mobley (2011). "Presence of putative repeat-in-toxin gene *tosA* in *Escherichia coli* predicts successful colonization of the urinary tract." MBio **2**(3): e00066-00011.
- Vigil, P. D., T. J. Wiles, M. D. Engstrom, L. Prasov, M. A. Mulvey and H. L. Mobley (2012). "The repeat-in-toxin family member TosA mediates adherence of uropathogenic *Escherichia coli* and survival during bacteremia." Infection and immunity **80**(2): 493-505.
- Vojtova, J., J. Kamanova and P. Sebo (2006). "*Bordetella* adenylate cyclase toxin: a swift saboteur of host defense." Current opinion in microbiology **9**(1): 69-75.
- Wagner, A. (2005). "Periodic extinctions of transposable elements in bacterial lineages: evidence from intragenomic variation in multiple genomes." Molecular biology and evolution **23**(4): 723-733.
- Wang, J. F., I. R. Kieba, J. Korostoff, T. L. Guo, N. Yamaguchi, H. Rozmiarek, P. C. Billings, B. J. Shenker and E. T. Lally (1998). "Molecular and biochemical mechanisms of *Pasteurella haemolytica* leukotoxin-induced cell death." Microbial pathogenesis **25**(6): 317-331.
- Warren, J. W., J. H. Tenney, J. M. Hoopes, H. L. Muncie and W. C. Anthony (1982). "A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters." The Journal of infectious diseases **146**(6): 719-723.
- Waters, V. L. and J. H. Crosa (1991). "Colicin V virulence plasmids." Microbiological reviews **55**(3): 437-450.
- Weingart, C. L. and A. A. Weiss (2000). "*Bordetella pertussis* virulence factors affect phagocytosis by human neutrophils." Infection and immunity **68**(3): 1735-1739.
- Welch, R. (1991). "Pore-forming cytolysins of Gram-negative bacteria." Molecular microbiology **5**(3): 521-528.
- Welch, R. (2001). RTX toxin structure and function: a story of numerous anomalies and few analogies in toxin biology. Pore-Forming Toxins, Springer: 85-111.

- Welch, R., C. Forestier, A. Lobo, S. Pellett, W. Thomas Jr and G. Rowe (1992). "The synthesis and function of the *Escherichia coli* hemolysin and related RTX exotoxins." FEMS microbiology immunology **5**(1-3): 29-36.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. Buckles, S.-R. Liou, A. Boutin and J. Hackett (2002). "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*." Proceedings of the National Academy of Sciences **99**(26): 17020-17024.
- Wells, T. J., M. Totsika and M. A. Schembri (2010). "Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization." Microbiology **156**(8): 2459-2469.
- Wiles, T. J., R. R. Kulesus and M. A. Mulvey (2008). "Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*." Experimental and molecular pathology **85**(1): 11-19.
- Wiles, T. J. and M. A. Mulvey (2013). "The RTX pore-forming toxin α -hemolysin of uropathogenic *Escherichia coli*: progress and perspectives." Future microbiology **8**(1): 73-84.
- Woida, P. J. and K. J. Satchell (2019). "*Vibrio cholerae* MARTX toxin multifunctionality silences inflammatory response to toxin mediated cytoskeletal collapse." bioRxiv: 526616.
- Woida, P. J. and K. J. Satchell (2020). "The *Vibrio cholerae* MARTX toxin silences the inflammatory response to cytoskeletal damage before inducing actin cytoskeleton collapse." Science Signaling **13**(614).
- Wooley, R. E., K. R. Spears, J. Brown, L. K. Nolan and O. J. Fletcher (1992). "Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*." Avian diseases: 679-684.
- Wu, K.-H. and P. C. Tai (2004). "Cys32 and His105 are the critical residues for the calcium-dependent cysteine proteolytic activity of CvaB, an ATP-binding cassette transporter." Journal of Biological Chemistry **279**(2): 901-909.
- Xicohtencatl-Cortes, J., A. Cruz-Córdova, V. Cázares-Domínguez, G. Escalona-Venegas, S. Zavala-Vega, J. Arellano-Galindo, M. Romo-Castillo, R. Hernández-Castro, S. A. Ochoa and V. M. Luna-Pineda (2019). "Uropathogenic *Escherichia coli* strains harboring *tosA* gene were associated to high virulence genes and a multidrug-resistant profile." Microbial pathogenesis **134**: 103593.
- Zhang, L., J. F. Conway and P. H. Thibodeau (2012). "Calcium-induced folding and stabilization of the *Pseudomonas aeruginosa* alkaline protease." Journal of Biological Chemistry **287**(6): 4311-4322.
- Zhao, L., S. Gao, H. Huan, X. Xu, X. Zhu, W. Yang, Q. Gao and X. Liu (2009). "Comparison of virulence factors and expression of specific genes between uropathogenic *Escherichia coli* and avian pathogenic *E. coli* in a murine urinary tract infection model and a chicken challenge model." Microbiology **155**(5): 1634-1644.

