

INRS-Institut Armand-Frappier

**Caractérisation des gènes *iroBCDEN* chez la souche *Escherichia coli* χ 7122
pathogène aviaire.**

Par

Mélissa Caza

Mémoire présenté

pour l'obtention

du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)

en Microbiologie appliquée

Jury d'évaluation

Président du jury

et examinateur interne

Richard Villemur, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

François Malouin,
Faculté des sciences,
Département de biologie
Université de Sherbrooke

Directeur de recherche

Charles M. Dozois, INRS-Institut Armand-Frappier

Codirecteur de recherche

François Lépine, INRS-Institut Armand-Frappier

© Droits réservés de Mélissa Caza, 2005

Résumé

Le système *iro* est composé de cinq gènes *iroBCDEN* qui sont responsables de la synthèse et de l'utilisation de nouveaux sidérophores nommés salmochelines. Ces sidérophores de type catécholate sont produits par *Salmonella enterica* et par certaines souches de *Escherichia coli*. Chez la souche *E. coli* χ 7122 pathogène aviaire (APEC), les gènes *iro* sont présents sur le plasmide de virulence pAPEC-1 et ils contribuent à la virulence de la bactérie dans le modèle d'infection aviaire. Le séquençage du système *iro* a mis en évidence des homologies de séquence entre IroB et une glycosyl transférase et entre IroC et un transporteur de type ABC. De plus, le produit du gène *iroD* montre une forte homologie avec l'estérase Fes de l'entérobactine et IroE semble être une hydrolase périplasmique putative de fonction inconnue. Quant à IroN, il a été caractérisé en tant que récepteur des salmochelines, bien qu'il puisse reconnaître le sidérophore entérobactine.

Les buts de ce projet furent donc de déterminer les rôles précis des gènes *iro* pour la synthèse et l'utilisation des sidérophores, ainsi que d'établir l'importance de la production des salmochelines et du récepteur IroN pour la virulence de la souche χ 7122 chez le poulet. L'importance des gènes *iro* pour la synthèse et l'utilisation des sidérophores a été déterminée en complémentant, avec un ou plusieurs gènes *iro* clonés sur des plasmides, des souches de *E.coli* défectueuses pour la production et l'utilisation de l'entérobactine. De plus, des tests *in vitro*, des analyses en spectrométrie de masse et une série d'infection chez le modèle animal ont été effectuées.

Ainsi, le récepteur IroN complète une souche mutante pour le récepteur du sidérophore entérobactine (*fepA*), en plus de présenter une sensibilité à la colicine B. Ces données suggèrent que IroN puisse fonctionner en tant que récepteur de l'entérobactine. Par ailleurs, une complémentation par les gènes *iroD* et *iroE* d'une souche mutante *fes*, incapable de dégrader l'entérobactine, suggère que ces gènes *iroD* et *iroE* codent pour des estérases. De plus, des analyses en spectrométrie de masse ont révélé que la production des salmochelines peut se faire en absence des gènes *iroN* et *iroC*. Aussi, la présence de *iroN* ou de *iroBCDE* seulement est insuffisante pour permettre une reprise de virulence chez la

souche mutante $\chi 7122$ *iro*. Finalement, la souche mutante $\chi 7122$ *entD*, qui ne synthétise plus l'entérobactine, est aussi incapable de synthétiser les salmochelines. D'ailleurs, ce mutant ne peut établir d'infection chez le poulet.

Les résultats obtenus suggèrent que la synthèse des salmochelines et de son récepteur IroN soit requise pour une pleine virulence de la souche APEC $\chi 7122$. En plus, la biosynthèse des salmochelines utilise la machinerie de synthèse de l'entérobactine.


Étudiante


Directeur de recherche

À ma mère

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche Charles M. Dozois pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche. C'est grâce à sa grande expertise et à son ingéniosité que j'ai pu contribuer à l'avancement de connaissances scientifiques dans le domaine de la pathogenèse bactérienne chez les espèces aviaires. Je suis aussi reconnaissante de la confiance qu'il m'a accordé tout au long de ce projet. De plus, je tiens également à le remercier de m'avoir fait découvrir le monde scientifique par son enseignement et par les nombreux voyages auxquels il m'a amenée. Le stage à l'Université de Washington, le congrès de l'ASM à la Nouvelle-Orléans et le CSM à Edmonton ont été des voyages mémorables. Merci beaucoup!

Ensuite, j'aimerais remercier mon codirecteur de recherche François Lépine pour son aide et ses bonnes idées. Il est responsable d'une grande part des résultats générés au cours de cette maîtrise. Je tiens aussi à le remercier de la confiance qu'il m'a portée lors de la réalisation des expériences en spectrométrie de masse. Je suis également reconnaissante envers Sylvain Milot pour son aide technique qui fut essentielle et très appréciée.

De plus, je tiens à remercier le Dr Roy Curtiss III pour m'avoir accueillie dans son laboratoire à l'Université de Washington pour un stage. Ce stage a renforcé ma volonté de persévérer dans le domaine scientifique.

Je suis aussi reconnaissante envers les membres du laboratoire et la Fondation Armand-Frappier.

Liste des figures

Figure 1.1 : Structure de l'entérobactine et du complexe ferri-entérobactine.....	26
Figure 1.2 : Biosynthèse du 2,3-DHB à partir du chorismate.....	27
Figure 1.3 : Domaines A-C-PCP-TE des gènes <i>entE</i> , <i>entB</i> et <i>entF</i> constituant le système NRPS.....	28
Figure 1.4 : Activation du 2,3-DHB par EntE à l'aide d'une molécule d'ATP.....	29
Figure 1.5 : Réaction posttranscriptionnelle du transfert de la partie phosphopantetheinyl du coenzyme A sur la sérine de la chaîne latérale du domaine PCP de EntB et EntF par EntD.....	29
Figure 1.6 : Formation de l'intermédiaire DHB-Ser-S-EntF.....	30
Figure 1.7 : Étape finale de la formation de l'entérobactine.....	31
Figure 1.8 : Schéma du système de transport et d'utilisation de l'entérobactine.....	36
Figure 1.9 : Produits de dégradation de l'entérobactine par l'estérase Fes.....	37
Figure 1.10 : Structures de l'entérobactine et des salmochelines SX, S1, S2 et S4.....	43
Figure 1.11 : Organisation génétique du système Iro.....	44
Figure 2.1 : Représentation schématique de l'amplification du produit de PCR servant à la mutation du gène <i>entD</i> par l'introduction de la cassette de résistance à la kanamycine de pKD4.....	56
Figure 2.2 : Schéma des constructions des plasmides pIJ20, pIJ33, pIJ34, pIJ37 et pIJ38.....	60
Figure 2.3 : Schéma des constructions des plasmides pIJ48, pIJ52 et pIJ54.....	62
Figure 2.4 : Schéma des constructions des plasmides pIJ35 et pIJ68.....	63
Figure 3.1 : Courbe de croissance de la souche H5058 et de ses dérivées dans le milieu NB avec 75 µM de dipyridyl.....	70
Figure 3.2 : Photos des souches H5058 et ses dérivées ensemencées sur milieu CAS.....	71

Figure 3.3 : Photos des souches H5058, H5058 (pIJ68) et H5058 (pIJ20) en présence de la colicine B.....	72
Figure 3.4°: Alignement des séquences protéiques des récepteurs IroN de <i>E. coli</i> χ 7122, IroN de <i>S. enterica</i> , FepA, PfeA, CirA, PirA et BfeA.....	77
Figure 3.5 : Alignements des séquences de boîte Fur retrouvées sur les promoteurs des gènes <i>iroN</i> , <i>pfeA</i> , <i>iucA</i> , <i>fepA</i> , <i>fur</i> , <i>iroB</i> et la séquence consensus de de Lorenzo.....	78
Figure 3.6 : Alignement des séquences protéiques de IroD de <i>E. coli</i> χ 7122, IroD de <i>S. enterica</i> , MceD de <i>K. pneumoniae</i> , McmK de <i>E. coli</i> , MchS1 de <i>E. coli</i> et Fes de <i>E. coli</i>	80
Figure 3.7 : Courbes de croissances des souches AN272 et ses dérivées dans le milieu NB avec 50 μ M de dipyridyl.....	82
Figure 3.8 : Photo des souches AN272 (pACYC184) et AN272 (pIJ52) sur milieu CAS.....	83
Figure 3.9 : Profil chromatographique du surnageant de la culture AN272 (pIJ54) (<i>iroE</i>) analysé par CL/SM.....	84
Figure 3.10 : Quantification des produits de dégradation de l'entérobactine retrouvés dans les surnageants de cultures des souches AN272 et ses dérivées après 18 h d'incubation.....	85
Figure 3.11 : Chromatogrammes des salmochelines SX, S1, S2 et S5 détectées à l'aide du spectromètre de masse par électronebulisation en mode positif.....	87
Figure 3.12 : Quantification des différentes salmochelines SX, S1, S2 et S5 détectées dans les surnageants des cultures de χ 7301, χ 7306, χ 7306 (pIJ20), χ 7306 (pIJ33), χ 7306 (pIJ34), χ 7306 (pIJ37) et χ 7306 (pIJ38).....	88
Figure 3.13 : Quantification de l'entérobactine et de ses produits de dégradation détectés dans les surnageants de cultures des souches χ 7301, χ 7306, χ 7306 (pIJ20), χ 7306 (pIJ33), χ 7306 (pIJ34), χ 7306 (pIJ37) et χ 7306 (pIJ38).....	89

Figure 3.14 : Log UFC / ml de bactéries dans le sang des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>), χ 7306 (pIJ33) (<i>iroN</i>) et χ 7306 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>) 6 h après l'infection	90
Figure 3.15 : Log UFC / ml de bactéries dans le sang des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>), χ 7306 (pIJ33) (<i>iroN</i>) et χ 7306 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>) 24 h après l'infection.....	91
Figures 3.16 : Log UFC / ml de bactéries dans le sang des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>), χ 7306 (pIJ33) (<i>iroN</i>) et χ 7306 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>) 48 h après l'infection.....	91
Figure 3.17 : Log UFC / g de bactéries retrouvées dans les poumons des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>), χ 7306 (pIJ33) (<i>iroN</i>) et χ 7306 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>).....	93
Figure 3.18 : Log UFC / g de bactéries retrouvées dans la rate des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>), χ 7306 (pIJ33) (<i>iroN</i>) et χ 7306 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>).....	93
Figure 3.19 : Log UFC / g de bactéries retrouvées dans le foie des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>), χ 7306 (pIJ33) (<i>iroN</i>) et χ 7306 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>).....	94
Figure 3.20 : Courbe de croissance de la souche 1017 et ses dérivés dans le milieu NB en présence de 75 μ M de dipyridyl.....	95
Figure 3.21 : Photo des souches 1017 (pACYC184) et 1017 (pIJ20) sur milieu CAS.....	96
Figure 3.22 : Log UFC /ml de bactéries dans le sang des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-) 6 h après l'infection.....	97
Figure 3.23 : Log UFC / ml de bactéries dans le sang des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-) 24 h après l'infection	97
Figure 3.24 : Log UFC / ml de bactéries dans le sang des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-).....	98

Figure 3.25 : Log de UFC / g de bactéries présentes dans les poumons des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-).....	99
Figure 3.26: Log de UFC / g de bactéries présentes dans la rate des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-).....	100
Figure 3.27 : Log de UFC / g de bactéries présentes dans le foie des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-).....	100

Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Homologies des protéines Iro de la souche <i>E. coli</i> χ 7122.....	47
Tableau 2.1 : Souches de <i>E. coli</i> K-12 utilisées.....	52
Tableau 2.2 : Souches de <i>E. coli</i> pathogènes aviaires et dérivées utilisées.....	53
Tableau 2.3 : Tableau récapitulatif des plasmides utilisés.....	64
Tableau 3.1 : Diamètres des zones d'inhibitions de croissance des souches BW25113 et H5058 mutantes et complémentées causées par la présence des colicines B et Ia.....	73
Tableau 3.2 : Évaluations des lésions au niveau des sacs aériens, du cœur et du foie causées par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>), χ 7306 (pIJ33) (<i>iroN</i>) et χ 7306 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>).....	92
Tableau 3.3 : Évaluation des lésions des organes causées par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-), sur une échelle de 1 à 4.....	99

Liste des abréviations

Aéro : aérobactine

ADN : acide désoxyribonucléique

Ap : ampicilline

APEC : *Escherichia coli* pathogène aviaire, « avian pathogenic *Escherichia coli* »

ArCP : « aryl carrier protein »

ARN : acide ribonucléique

BHI : milieu « brain heart infusion »

CAS : chrome azurol S

CL / SM : chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse

Cm : chloramphénicol

CMH : complexe majeur d'histocompatibilité

DAEC : *Escherichia coli* d'adhérence diffuse

DHBS : 2,3-dihydroxybenzoyl sérine

Domaine A : domaine d'adénylation

Domaine C : domaine de condensation

Domaine TE : domaine thioestérase

EAEC : *Escherichia coli* entéroaggrégative

ECNM : *Escherichia coli* causant la méningite néonatale

E. coli : *Escherichia coli*

ECOR : « *Escherichia coli* Reference Collection »

EHEC : *Escherichia coli* entérohémorragique

EIEC : *Escherichia coli* entéroinvasive

Ent : entérobactine

EPEC : *Escherichia coli* entéropathogène

ETEC : *Escherichia coli* entérotoxigénique

ExPEC : *Escherichia coli* pathogène extra-intestinale

Fe²⁺ : fer ferreux

Fe³⁺ : fer ferrique

FURTA : expérience de titration par Fur

HDTMA : hexadecyltrimethylammonium
IBV : virus de la bronchite infectieuse
Iro : locus *iroA*
K. pneumoniae : *Klebsiella pneumoniae*
LB : milieu Luria-Bertani
LPS : lipopolysaccharide
LT : toxine thermolabile
MECAM : 1,3,5-N,N',N''- tris-(2,3-dihydroxybenzoyl)triaminomethylbenzene
MLEE : « multilocus enzyme electrophoresis »
MLST : « multilocus sequence typing »
MRSH : hemagglutinine mannose-resistant
MSHA : hemagglutinine mannose-sensible
NB : « nutrient broth »
NDV : virus de la maladie de Newcastle
NE : norépinéphrine
NRPS : « non-ribosomal peptide synthetase »
P. aeruginosa : *Pseudomonas aeruginosa*
PAIs : îlots de pathogénicité
PBS : tampon phosphate saline
PCP : « peptidyl carrier protein »
PCR : réaction de polymérisation en chaîne
RT-PCR : réaction de polymérisation en chaîne en temps réel
SCOTS : captures sélectives de séquences transcrites
S. enterica : *Salmonella enterica*
SHS : « swollen head syndrome » syndrome de la tête enflée
SRF : facteur de résistance à *Salmonella*
ST : toxine thermostable
S. typhi : *Salmonella typhi*
S. typhimurium : *Salmonella typhimurium*
Tc : tétracycline
TREMAM : 2,2',2''-tris(2,3-dihydroxybenzamido)triethylammonium

TSA: « tryptic soy agar »

Tsh : hémagglutinine thermosensible

UFC: unité formatrice de colonie

UPEC : *Escherichia coli* uropathogène

Vat: toxine autotransporteur vacuolante

Table des matières

Résumé	III
Remerciements	VI
Liste des figures	VII
Liste des tableaux	XI
Liste des abréviations	XII
Table des matières	XV
Introduction	1
Chapitre I	5
Revue de littérature	5
1.1 <i>Escherichia coli</i>	6
1.2 La distribution phylogénétique des <i>E. coli</i> et la collection ECOR	7
1.3 La classification sérologique des <i>E. coli</i>	8
1.4 Les maladies causées par les souches APEC	9
1.4.1 Les infections de la membrane vitelline	9
1.4.2 L'aérosacculite.....	9
1.4.3 La colibacillose aviaire	10
1.4.4 Les infections de l'oviducte.....	10
1.4.5 La cellulite aviaire.....	10
1.4.6 Le syndrome de la tête enflée (SHS)	11
1.5 Les caractéristiques des souches APEC	11
1.5.1 Les différents sérogroupes	11
1.5.2 Les facteurs de virulence des souches APEC	11
1.5.2.1 Les fimbriae type 1	12
1.5.2.2 Les fimbriae P	12
1.5.2.3 Les fimbriae curli.....	13
1.5.2.4 Le plasmide de virulence pColV.....	13
1.5.2.5 Le sidérophore aérobactine	14
1.5.2.6 L'antigène capsulaire K	16
1.5.2.7 Tsh : l'hémagglutinine thermosensible.....	16
1.5.2.8 L'autotransporteur Vat.....	18
1.5.2.9 La résistance au sérum	18
1.5.2.10 La survie et la résistance aux macrophages	19
1.5.2.11 Les toxines et les hémolysines.....	19
1.5.3 Les facteurs de virulence APEC retrouvés chez les ExPEC.....	20
1.6 L'importance du fer dans les différents processus biologiques	20
1.7 Les protéines liant le fer chez les humains et les animaux	22

1.8 L'acquisition du fer chez la bactérie	23
1.9 L'entérobactine	26
1.10 Le transport, la dégradation et la régulation de l'entérobactine	31
1.10.1 EntS: la protéine d'exportation de l'entérobactine	31
1.10.2 La formation du complexe ferri-entérobactine	32
1.10.3 Le transporteur de type ABC	32
1.10.4 Le récepteur FepA.....	33
1.10.5 Le complexe TonB-ExbB-ExbD.....	33
1.10.6 La protéine FepB.....	35
1.10.7 Le complexe FepCDG	35
1.10.8 La dégradation de l'entérobactine par Fes	36
1.10.9 La régulation de l'entérobactine	37
1.11 L'entérobactine : facteur de virulence	38
1.12 Les colicines B et Ia	41
1.13 Les salmochelines	42
1.13.1 Les gènes <i>iroBCDEN</i>	43
1.13.1.1 Le gène <i>iroB</i>	44
1.13.1.2 Le gène <i>iroC</i>	44
1.13.1.3 Les gènes <i>iroD</i> et <i>iroE</i>	45
1.13.1.4 Le gène <i>iroN</i>	45
1.14 Les salmochelines : facteurs de virulence	48
Chapitre II	51
Matériel et méthodes	51
2.1 Les souches utilisées	52
2.2 Les milieux de croissance et les milieux sélectifs	53
2.3 Les analyses bioinformatiques	55
2.4 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	55
2.5 La mutagénèse	56
2.6 Les constructions plasmidiques	58
2.6.1 Les plasmides <i>iro</i>	59
2.6.2 Les plasmides de complémentations.....	62
2.6.3 Les autres plasmides utilisés.....	63

2.7 Les souches transformées	65
2.8 Les courbes de croissances	65
2.9 Les extractions des colicines B et Ia et tests de sensibilités	65
2.10 Les extractions à l'acétate d'éthyle de l'entérobactine et de ses	66
produits de dégradation	66
2.11 La purification des salmochelines et de l'entérobactine par colonne.....	67
DE52 DEAE-cellulose	67
2.12 Les analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre	67
de masse (CL/SM)	67
2.13 Les infections chez le modèle aviaire.....	68
Chapitre III.....	69
Résultats.....	69
3.1 La caractérisation du gène <i>iroN</i>.....	70
3.2 La caractérisation des gènes <i>iroD</i> et <i>iroE</i>	78
3.3 La production des salmochelines.....	86
3.4 L'interrelation entre la production des salmochelines et de	94
l'entérobactine.....	94
Chapitre IV.....	102
Discussion.....	102
4.1 La caractérisation du gène <i>iroN</i>.....	103
4.2 La caractérisation des gènes <i>iroD</i> et <i>iroE</i>	106
4.3 La production des salmochelines.....	109
4.4 L'interrelation entre la synthèse de l'entérobactine et des	116
salmochelines	116
Conclusion	123
Références	125

Introduction

Chez les humains et les animaux, une très grande quantité de fer se retrouve complexée à des protéines de haute affinité. La formation de ces complexes est causée par l'extrême insolubilité et la toxicité du fer ferrique en présence d'oxygène et à pH 7,0 (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Braun et Braun, 2002a). Il est donc primordial pour un organisme de séquestrer le fer de façon contrôlable à l'aide de diverses protéines. La transferrine, la lactoferrine et l'ovotransferrine sont les protéines de séquestration du fer retrouvées dans les différents fluides corporels et dans le blanc des œufs. Ces protéines sont des glycoprotéines monomériques possédant une constante d'affinité avec le fer de 10^{36} et ne sont généralement qu'en partie saturées (Ratledge et Dover, 2000). Ces caractéristiques leur confèrent la capacité de séquestrer le fer libre de l'organisme et ainsi empêchent l'insolubilité et la toxicité du métal sous ces conditions physiologiques.

Par ailleurs, Shade et Caroline ont découvert, en 1944, que la présence de protéines de haute affinité pour le fer dans le sang et dans les blancs d'œufs pouvait inhiber la croissance de plusieurs bactéries. Ils ont déduit que ces protéines liaient trop fortement le fer pour le rendre disponible aux bactéries, inhibant ainsi leurs croissances (Schade et Caroline, 1944). En fait, ces chercheurs ont établi le lien entre la résistance de l'organisme hôte et la capacité pathogénique des bactéries virulentes à contrecarrer cette résistance innée. Kochan a d'ailleurs proposé, en 1973, le concept d'immunité nutritionnelle afin de décrire ce phénomène de disponibilité limitée des nutriments essentiels pour la survie microbienne chez l'hôte (Griffiths, 1999).

Ce concept d'immunité nutritionnelle s'applique parfaitement à la séquestration du fer chez les humains et les animaux. En effet, les bactéries nécessitent une concentration interne de fer entre 10^{-7} M à 10^{-5} M, afin de subvenir à leurs divers processus biologiques essentiels à leur prolifération, tels que la régulation et la biosynthèse de l'ADN. Or, il a été calculé que l'équilibre entre le fer libre disponible et le fer complexé aux diverses protéines se situe au environ de 10^{-18} M (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Litwin et Calderwood, 1993; Ratledge et Dover, 2000). Ainsi, lors d'une infection par une bactérie

pathogène, la quantité de fer libre disponible est nettement insuffisante pour permettre à cette dernière d'assurer sa survie et sa multiplication dans l'organisme hôte.

Les bactéries pathogènes ont donc développé des systèmes, tels que les sidérophores, l'incorporation des transferrines, la réduction du fer ferrique en fer ferreux et les transporteurs de métaux de type ABC, afin de subvenir à leur besoin en fer. Les sidérophores sont d'ailleurs une des stratégies les plus exploitées parmi les bactéries. Ces molécules de faible poids moléculaire ont une haute affinité pour le fer ferrique, ce qui leur concède la propriété de chélation du fer (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003). Suite à la synthèse et à la sécrétion des sidérophores, ceux-ci ont pour fonction de se lier à un ion ferrique et former un complexe ferri-sidérophore. Ce complexe sera par la suite internalisé dans la bactérie par un récepteur et un transporteur de type ABC et ce complexe sera dégradé par des enzymes qui libéreront l'ion ferrique au sein du cytoplasme bactérien.

Il existe plus de 500 différents sidérophores connus à ce jour (Ferguson et Deisenhofer, 2002). L'entérobactine et l'aérobactine sont deux sidérophores synthétisés et sécrétés par la bactérie *Escherichia coli* et qui ont fait l'objet de plusieurs études. L'entérobactine est d'ailleurs un puissant chélateur de fer dont la constante d'affinité est de 10^{52} (Bullen *et al.*, 2000; Earhart, 1987). L'aérobactine est un sidérophore de moindre affinité pour le fer que l'entérobactine, mais il est 500 fois plus efficace que l'entérobactine pour stimuler la croissance bactérienne en milieu pauvre en fer. Cette caractéristique est attribuable à la réutilisation du sidérophore contrairement à l'entérobactine (Williams et Carbonetti, 1986). Le rôle de l'aérobactine pour la virulence des souches des *E. coli* pathogènes est bien défini. Ce sidérophore participe activement à l'établissement de l'infection bactérienne (Lafont *et al.*, 1987; Warner *et al.*, 1981; Williams, 1979). Cependant, le rôle de l'entérobactine pour la virulence de ces souches n'est pas aussi bien défini. En fait, il existe une controverse sur le sujet; plusieurs ont démontré que la production de l'entérobactine est essentielle à la prolifération bactérienne *in vivo* selon les souches et les modèles animaux utilisés, tandis que d'autres ont démontré le contraire (Benjamin *et al.*, 1985; Furman *et al.*, 1994; Rabsch *et al.*, 2003; Rogers, 1973; Torres *et al.*, 2001). Or, l'importance de l'entérobactine lors d'une infection reste encore à déterminer.

Récemment, de nouveaux sidérophores de type catécholate, les salmochelines, ont été caractérisés chez *Salmonella enterica* sérotype Stanleyville (Hantke *et al.*, 2003), et leurs structures sont très similaires à celle de l'entérobactine (Bister *et al.*, 2004). Les gènes *iroBCDEN*, aussi nommé locus *iroA*, codent pour la synthèse, l'utilisation et probablement pour la dégradation des salmochelines. Ce locus a d'abord été découvert chez *Salmonella typhimurium*, en 1992, par Foster et Hall (Foster et Hall, 1992). Cependant, la découverte des gènes *iroBCDEN* ne s'est faite qu'en 1998 par Bäumlér et ses collaborateurs (Baumlér *et al.*, 1998). Depuis, les gènes *iroBCDEN* ne sont toujours pas entièrement caractérisés. Les comparaisons des séquences protéiques codées par les gènes *iroBCDEN* ont révélé que IroB s'apparente à une glycosyl transférase, IroC à un transporteur de type ABC, IroD à une estérase cytoplasmique, IroE à une hydrolase périplasmique et IroN à un récepteur de sidérophore. En fait, seul le gène *iroN* a été passablement étudié et il a été identifié comme étant le récepteur des salmochelines (Hantke *et al.*, 2003). Par ailleurs, dans une étude publiée très récemment, les structures des salmochelines ont été élucidées. Il existe en fait sept salmochelines (SX, S0, S1, S2, S3, S4 et S5), et c'est la salmocheline S4 qui représente le sidérophore majeur (Bister *et al.*, 2004). Néanmoins, le fonctionnement du système Iro et le rôle de chaque gène pour la biosynthèse, le transport, l'utilisation et la virulence restent encore à découvrir.

Dans une étude récente, Dozois et ses collaborateurs ont démontré que les gènes *iroBCDEN* sont requis pour l'établissement d'une infection chez les poulets par la bactérie *E. coli* pathogène aviaire χ 7122 (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). En fait, ils ont prouvé que les mutations inactivant l'aérobactine, l'hémagglutinine thermosensible (Tsh) et les salmochelines atténuent complètement la virulence de la souche, de telle sorte qu'elle ne peut survivre et proliférer au sein des animaux. Cependant, la réintroduction des gènes *iroBCDEN* dans cette souche lui redonne sa capacité infectieuse, et ce, avec une intensité similaire à la souche sauvage (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). Ces résultats ont donc mis en lumière l'importance du système Iro pour la virulence de cette souche pathogène aviaire. Maintenant, il reste à déterminer si tout le système ou seulement quelques gènes spécifiques sont requis pour la virulence de la souche. Russo et ses collaborateurs ont d'ailleurs tenté de répondre à cette question. Dans leur étude, ils ont démontré qu'une mutation du récepteur IroN dans la souche *E. coli* CP9 diminuait significativement la

détection de la souche dans la vessie, les reins et l'urine dans le modèle d'infection du tractus urinaire ascendant chez la souris lors d'infection en compétition avec la souche sauvage. Cette expérience a donc démontré que l'expression du récepteur IroN était essentielle à la souche CP9. Ce groupe de recherche a conclu que IroN représentait un facteur de virulence important (Russo *et al.*, 2002). Or, la découverte de la synthèse des salmochelines par les gènes *iro* donne un autre sens au rôle de ce récepteur pour la virulence de la souche lors d'une infection.

Par ailleurs, l'étude de la souche pathogène χ 7122 et des autres souches de *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) se justifie par les énormes pertes économiques et alimentaires subies par l'industrie avicole annuellement. Aux États-Unis, les pertes sont calculées à 40 \$ millions par année (Stocki *et al.*, 2002). La souche *E. coli* χ 7122 cause l'aérosacculite, qui est due à une infection du tractus respiratoire. Cette maladie, parfois létale, entraîne une perte d'appétit des animaux, ce qui occasionne une diminution de croissance. De plus, cette infection respiratoire peut dégénérer en une septicémie et causer des lésions sévères aux niveaux du péricarde, du foie et de la membrane péritonéale. Tous ces facteurs condamnent ainsi les carcasses et engendrent des pertes économiques substantielles à l'industrie avicole (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

Bien que le système Iro ait été trouvé important pour la virulence de la souche χ 7122, la caractérisation de chaque gène du système et leur implication lors de l'infection restent encore à éclaircir. Ce projet porte donc sur la caractérisation des gènes *iroBCDEN* chez la souche *Escherichia coli* pathogène aviaire χ 7122. Quatre volets ont été explorés au cours de cette étude. Tout d'abord, il y a eu la caractérisation du gène *iroN*, ainsi que des gènes *iroD* et *iroE*. Par la suite, le rôle des gènes *iro* pour la production des salmochelines et pour la virulence de la souche a été déterminé. Finalement, l'interrelation entre la synthèse de l'entérobactine et celle des salmochelines, ainsi que son importance lors des infections chez le modèle aviaire ont été examinés.

Chapitre I

Revue de littérature

1.1 Escherichia coli

Escherichia coli est une bactérie Gram-négative membre de la famille des *Enterobacteriaceae* (Prescott, Harley et Klein, 1995). Cette bactérie fait partie de la microflore intestinale humaine et animale, cependant plusieurs ont acquis la capacité de causer une panoplie d'infections intestinales et systémiques (Dozois et Curtiss, 1999). Les différences entre les bactéries commensales et pathogènes résultent d'un équilibre complexe entre l'hôte et la présence de facteurs de virulences chez la bactérie (Picard *et al.*, 1999).

Les différentes souches de *E. coli* pathogènes ont été classées en sept groupes : ETEC, EPEC, EHEC, EAEC, DAEC, EIEC et ExPEC. Tout d'abord, les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC) produisent des toxines thermolabiles (LT) et thermostables (ST) et causent la diarrhée, qui est souvent associée aux voyageurs. Les souches de *E. coli* entérotoxigènes (EPEC) causent de la diarrhée persistante, de la fièvre et des vomissements chez les enfants et les animaux. *E. coli* entérohémorragique (EHEC) est associée à la diarrhée endémique et épidémique, les colites hémorragiques et le syndrome d'urémie hémolytique. D'ailleurs, ces souches bactériennes sécrètent les vérotoxines 1 et 2. Quant à *E. coli* entéroaggrégative (EAEC) et *E. coli* d'adhérence diffuse (DAEC), elles procurent une diarrhée persistante, tandis que *E. coli* entéroinvasif (EIEC) a la capacité de pénétrer les cellules de l'épithélium intestinal et ainsi causer de la diarrhée et de la dysenterie chez les humains et les primates (Dozois et Curtiss, 1999; Farthing, 2004; Nataro J.P., 1994).

Finalement, *E. coli* pathogène extra-intestinal (ExPEC) regroupe, entre autres, les souches uropathogènes (UPEC) qui causent des infections au niveau du tractus urinaire, et les souches de *E. coli* responsables de la méningite néonatale (ECNM) et de la septicémie néonatale. De plus, ces souches peuvent causer des pneumonies, des bactériémies, des infections abdominales et pelviennes et des infections au site chirurgical. Les infections extra-intestinales causées par les souches ExPEC coûtent des milliards de dollars chaque année aux États-Unis, et ce, sans compter les coûts engendrés par les frais hospitaliers.

Chaque année, à travers le monde, les divers syndrômes et maladies causés par les souches ExPEC sont responsables de la mort de centaines de milliers de personnes (Russo et Johnson, 2003). Parmi les souches ExPEC se retrouvent les souches pathogènes associées à des maladies distinctes à un hôte. Par exemple, les souches de *E. coli* pathogènes pour les espèces aviaires (APEC) peuvent causer plusieurs maladies et syndromes chez la volaille, telles que les infections de la membrane vitelline des œufs, la colibacillose aviaire, le syndrome de la tête enflée et la cellulite aviaire (Dozois et Curtiss, 1999). D'ailleurs, ces différentes infections sont responsables de pertes économiques sévères pour l'industrie avicole à travers le monde (Gross, 1994).

1.2 La distribution phylogénétique des *E. coli* et la collection ECOR

Escherichia coli est une espèce génétiquement très diversifiée. Comme en témoignent les nombreuses classes mentionnées ci-haut, *E. coli* cause diverses pathogénies chez plusieurs hôtes. Cette pathogénicité est attribuable à la présence de facteurs de virulences chez les souches pathogènes et qui sont absents des souches commensales. Dans plusieurs cas, la pathogénicité corrèle avec la présence de gènes de virulences qui sont organisés en larges blocs nommés îlots de pathogénicité (PAIs) (Picard *et al.*, 1999). Chez les isolats de *E. coli* pathogènes, cinq îlots de pathogénicité ont été initialement identifiés, soit PAIs I, II, III, IV et V. Ces PAIs arborent une pléiade de gènes qui codent pour des facteurs de virulence. De plus, il a été proposé que ces îlots aient été acquis par transfert horizontal d'ADN étranger au génome des *E. coli*, modifiant ainsi le potentiel pathogénique des souches (Dozois et Curtiss, 1999; Hacker *et al.*, 1997). Depuis, plusieurs autres îlots de pathogénicité ont été identifiés chez de nombreuses souches pathogènes.

Des approches phylogénétiques ont été réalisées, afin de relier les différentes souches de *E. coli* commensales et pathogènes à un ancêtre commun. La collection ECOR (*Escherichia coli* Reference Collection), qui comprend 72 souches de *Escherichia coli* isolées d'une variété d'hôtes et de localisations géographiques, a été fondée (Ochman et Selander, 1984). Par la suite, la distribution phylogénétique des 72 souches a été établie selon la technique de « multilocus enzyme electrophoresis » (MLEE) ou par l'analyse des séquences d'ADN

des gènes métaboliques conservés (MLST) à l'aide de 38 enzymes métaboliques. Ainsi, les 72 souches ont été classées en 5 groupes, soit A, B1, B2, D et E. Parmi la collection ECOR, le groupe A représente les souches K-12 et commensales isolées principalement des humains, tandis que plusieurs souches du groupe B1 sont originaires des mammifères autres que les primates (Herzer *et al.*, 1990). Par ailleurs, le groupe B2 est fortement divergeant des autres groupes et il englobe la majorité des souches responsables des infections extra-intestinales (Picard *et al.*, 1999). De plus, les groupes B2 et D sont composés de souches ayant les plus gros génomes, car ils possèdent généralement des îlots de pathogénicité. Plusieurs facteurs de virulence importants pour les infections extra-intestinales sont donc associés à ces groupes phylogénétiques (Boyd et Hartl, 1998; Johnson *et al.*, 2001). En plus, il existe une relation entre la pathogénicité des souches et leurs distributions phylogénétiques. Ainsi, le groupe B2 représente des souches hautement virulentes, le groupe D contient des souches de virulence moyenne, tandis que les groupes A et B1 possèdent principalement des souches avirulentes (Picard *et al.*, 1999). Le groupe E représente des souches non classées (Herzer *et al.*, 1990).

1.3 La classification sérologique des *E. coli*

Les souches de *E. coli* peuvent être classifiées en trois groupes selon leurs composantes antigéniques présentes à la surface de la cellule. Le sérotypage de *E. coli* est basé sur l'identification des antigènes O, K et H. Les antigènes O sont des facteurs somatiques qui font partis des lipopolysaccharides (LPS). Les LPS sont composés du lipide A, du polysaccharide central et de la chaîne latérale O ou antigène O. Cet antigène est formé par des répétitions de sous-unités de la chaîne de polysaccharides, ce qui engendre la grande diversité des antigènes O. Il existe en fait 167 sérogroupes O différents. (Lior, 1994; Prescott, Harley et Klein, 1995; Whitfield et Roberts, 1999) Par ailleurs, les antigènes K sont des facteurs polysaccharides acides qui composent la capsule bactérienne et un peu plus de 80 polysaccharides différents ont été répertoriés à ce jour. (Lior, 1994; Whitfield et Roberts, 1999) Finalement, les antigènes H représentent les déterminants sérologiques trouvés sur la flagelline, la protéine qui constitue les flagelles. Plus de 50 antigènes H ont été caractérisés chez *E. coli* (Lior, 1994).

1.4 Les maladies causées par les souches APEC

1.4.1 Les infections de la membrane vitelline

Plusieurs maladies des espèces aviaires sont dues à une infection par *E. coli*. Tout d'abord, les infections de la membrane vitelline des œufs peuvent causer la mort prématurée des embryons ou des poussins. En plus, ces infections sont plus virulentes et mortelles vers la fin de la période d'incubation des œufs et elles sont généralement dues à une contamination fécale de la surface des œufs (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

1.4.2 L'aérosacculite

L'aérosacculite, communément appelée la maladie du sac aérien, est une importante maladie dont les différentes espèces aviaires peuvent souffrir. Cette maladie est causée par une infection du tractus respiratoire par les souches APEC. Généralement, l'infection des voies respiratoires a lieu suite à une infection préalable du tractus par des agents pathogènes tels que le virus de la maladie de Newcastle (NDV), le virus de la bronchite infectieuse (IBV) ou par *Mycoplasma gallisepticum*. L'aérosacculite est observée chez les poulets âgés entre 4 et 9 semaines et il engendre une diminution de la croissance des oiseaux due à une perte d'appétit, une augmentation de 20% de la mortalité des animaux, en plus d'une hausse du taux de rejet des carcasses à l'abattoir. De plus, l'infection du tractus respiratoire peut se transformer en une septicémie et une infection générale. À ce stade, plusieurs lésions sont observables au niveau du péricarde, du foie et de la membrane péritonéale. Tous ces facteurs causent des pertes économiques importantes pour l'industrie avicole. Or, les causes de la contraction des infections causées par les souches APEC sont la promiscuité des lieux d'élevage et la contamination par la nourriture et l'eau. Toutefois, la principale route d'infection est l'inhalation de la poussière contaminée par les fèces des animaux (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

1.4.3 La colibacillose aviaire

Les différentes manifestations cliniques causées par les souches APEC, incluant l'aérosacculite, la péricardite, la périhépatite, la péritonite et la septicémie, sont des symptômes de la colibacillose aviaire aussi connue sous le nom de colisepticémie (La Ragione et Woodward, 2002; White *et al.*, 1993).

1.4.4 Les infections de l'oviducte

Chez les poules pondeuses, une infection du sac aérien gauche par les souches APEC peut mener à une infection de l'oviducte. Les conséquences d'une telle infection sont le développement d'une salpingite et la perte de la capacité à pondre des œufs. De plus, lors d'une telle infection, la bactérie peut pénétrer directement dans les œufs en formation et causer des dommages à la membrane vitelline (La Ragione et Woodward, 2002). Par ailleurs, une infection de l'oviducte peut mener à une infection de la membrane péritonéale et causer la mort de la poule pondeuse (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

1.4.5 La cellulite aviaire

La cellulite aviaire, aussi appelée dermatite nécrotique, cause des lésions épidermiques dans la région de l'abdomen inférieur et au niveau des hanches des animaux. Des plaques fibreuses sous-cutanées sont clairement visibles chez les animaux atteints (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994). Cette maladie, bien qu'elle ne soit pas mortelle, est responsable de pertes substantielles dues au rejet des carcasses ou au déclassement de la qualité de la viande. Aux États-Unis, les pertes annuelles à l'industrie avicole ont été estimées à 40 \$ millions (Stocki *et al.*, 2002). Au Brésil, ces pertes économiques se chiffrent à 10 \$ millions par années (de Brito, Gaziri et Vidotto, 2003). *E. coli* est l'agent causal prédominant de cette maladie, bien que d'autres espèces bactériennes puissent être aussi responsables. Le sérotype O78 : K80 est d'ailleurs le plus fréquemment retrouvé chez les animaux malades, bien que les sérotypes O1 et O2 y soient aussi associés (Gross, 1994).

1.4.6 Le syndrome de la tête enflée (SHS)

Une autre maladie spécifique aux poulets causée par les souches APEC est le syndrome de la tête enflée («swollen head syndrome») (SHS). Les symptômes de cette maladie incluent de l'œdème, de la cellulite sur la peau du visage et des dermatites sur la partie inférieure de l'abdomen de l'animal. Cette maladie et les symptômes associés ne sont toutefois pas mortels pour les animaux, mais il en résulte tout de même une perte économique substantielle pour l'industrie avicole due au rejet des carcasses (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

1.5 Les caractéristiques des souches APEC

1.5.1 Les différents sérogroupes

Les souches de *E. coli* pathogènes pour les espèces aviaires font majoritairement partie des sérogroupes O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 et O115. Cependant, d'autres sérogroupes ont aussi été incriminés. Néanmoins, la plupart des souches causant la colibacillose se retrouvent dans les sérogroupes O1, O2 et O78 (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). D'ailleurs, plusieurs études ont démontré que ces sérogroupes possèdent des facteurs de virulence spécifiques pour la colonisation et le développement d'infections extra-intestinales (White *et al.*, 1993).

1.5.2 Les facteurs de virulence des souches APEC

Chez les souches APEC, plusieurs facteurs de virulence sont reconnus pour leur importance dans l'établissement d'une infection. Les fimbriae type 1, P et curli, le plasmide pColV, l'aérobactine, l'antigène capsulaire K, l'hémagglutinine thermosensible (Tsh), l'autotransporteur Vat, la résistance au sérum et la résistance aux phagocytes sont tous des facteurs importants pour la virulence des souches pathogéniques APEC (Delicato *et al.*, 2003; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Mellata *et al.*, 2003b; Parreira et Gyles, 2003).

1.5.2.1 Les fimbriae type 1

Tout d'abord, les fimbriae type 1, codés par les gènes *fim*, sont des adhésines ayant la capacité d'adhérer aux érythrocytes de plusieurs animaux, aux levures et à plusieurs autres cellules. Ces fimbriae perdent leur adhérence aux érythrocytes en présence de mannose, d'où l'utilisation des termes mannose-sensible et adhérence mannose-spécifique (Low, Braaten et Van Der Woude, 1996). Ces fimbriae sont aussi nommés hémagglutinines mannose-sensibles (MSHA) (Dozois, Pourbakhsh et Fairbrother, 1995). Par ailleurs, il existe une corrélation entre l'expression des fimbriae type 1 et la septicémie chez les poulets (Dozois *et al.*, 1992). De plus, des expériences *in vitro* ont permis de démontrer la participation des fimbriae type 1 à l'adhésion des bactéries à l'épithélium de la trachée des poulets (Dozois, Pourbakhsh et Fairbrother, 1995). Par la suite, des expériences *in vivo* ont confirmé l'importance des fimbriae type 1 pour la colonisation de la trachée, des sacs aériens et des poumons lors de l'infection (Dozois *et al.*, 1994; Pourbakhsh *et al.*, 1997c). Ainsi, il a été conclu que les fimbriae type 1 sont importants pour la colonisation bactérienne initiale du tractus respiratoire supérieur (Pourbakhsh *et al.*, 1997c). Néanmoins, la relation directe entre la présence des fimbriae type 1 et leur contribution dans la colibacillose aviaire est encore à démontrer.

1.5.2.2 Les fimbriae P

Les fimbriae P, codés par les gènes *pap*, sont des hémagglutinines de type mannose-résistant (MRHA), c'est-à-dire que leur propriété d'adhérence n'est pas affectée par la présence de mannose (Low, Braaten et Van Der Woude, 1996). Ces fimbriae sont d'ailleurs associées aux infections du tractus urinaire chez l'humain (Dozois, Pourbakhsh et Fairbrother, 1995). La présence des gènes *pap* chez les souches APEC est associée avec la septicémie chez les poulets, mais très peu de ces fimbriae font partie de la classe MRHA (Dozois *et al.*, 1992). Contrairement aux fimbriae type 1, les fimbriae P n'adhèrent pas à l'épithélium trachéal des poulets, mais bien aux cellules épithéliales des sacs aériens. En plus d'être retrouvés dans les sacs aériens, les fimbriae P sont exprimés dans les poumons, les reins, le sang et le fluide péricardique. Ces dernières découvertes suggèrent que les

fimbriae P jouent un rôle important dans les étapes tardives de l'infection bactérienne (Pourbakhsh *et al.*, 1997c).

1.5.2.3 Les fimbriae curli

Les fimbriae curli, codés par les gènes *csg*, sont de minces appendices hautement agrégatifs exprimés à la surface de la bactérie. La synthèse des curli dépend des gènes régulateurs *csgD*, *mlrA* et *rpoS* (Brown *et al.*, 2001). De plus, ces fimbriae, de type hémagglutinine mannose-résistant (MRHA), ont la capacité de lier la fibronectine, la laminine, le plasminogène et le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe 1 (Brown *et al.*, 2001; La Ragione, Cooley et Woodward, 2000). En plus, il a été démontré que les curli adhèrent à l'épithélium intestinal aviaire et permettent la persistance des bactéries dans les caecums des poulets (La Ragione, Collighan et Woodward, 1999; La Ragione, Cooley et Woodward, 2000). Néanmoins, la relation directe entre les fimbriae curli et leur contribution dans la colibacillose aviaire reste encore à découvrir.

1.5.2.4 Le plasmide de virulence pColV

Les plasmides pColV forment un groupe de plasmides hétérogènes associés à la virulence des souches APEC et certaines souches ExPEC. La présence de pColV chez les souches de *E. coli* pathogènes confère à celles-ci la virulence nécessaire à l'établissement d'une infection, contrairement à une souche de *E. coli* qui ne possède pas le plasmide (Smith, 1974). Toutefois, il existe d'autres types de plasmides de virulence, bien que pColV soit un des plus étudiés. Les plasmides pColV sont de grandes tailles et peuvent coder pour plusieurs facteurs de virulence tels que le sidérophore aérobactine, la résistance au complément et à la phagocytose, le flagelle, l'adhérence aux cellules intestinales et Tsh (Dozois *et al.*, 2000; Waters et Crosa, 1991).

Les gènes codant pour la colicine V, toxine produite par des souches de *E. coli* pathogène, se situent souvent sur le plasmide de virulence pColV. Cependant, la relation entre la production de la colicine et la virulence des souches pathogènes n'est pas clairement définie. Plusieurs études ont montré des résultats divergeants sur l'importance de la

colicine V pour la virulence des souches bactériennes. Wooley et ses collaborateurs ont démontré une corrélation entre la production de la colicine V et la létalité chez embryons de poulets. Cependant, cette étude ne fait pas mention de la présence ou de l'absence du plasmide pColV, qui pourrait être à l'origine de la virulence de la souche (Wooley *et al.*, 1993). Ils ont aussi démontré que la colicine V et qu'un phénotype de motilité - phénotype probablement dû à une surexpression des fimbriae type 1, mais dont la caractérisation génétique n'a pas été effectuée - participaient à la colonisation de la trachée des poulets lors des premières étapes de l'infection. Toutefois, l'expérience ne démontre pas l'effet de chacun séparément (Wooley *et al.*, 1998). De plus, Blanco et ses collaborateurs ont établi une relation entre la présence de la colicine V et la haute pathogénicité des souches APEC par des infections sur des souris (Blanco *et al.*, 1997). Par ailleurs, une étude de Quackenbush et Falkow a démontré clairement le peu d'importance du rôle de la colicine V dans la virulence des souches de *E. coli*. En effet, l'abolition de la production de la colicine V par mutation génétique n'anéantit pas la capacité des souches de *E. coli* à tuer des souris adultes 18 h après l'inoculation (Quackenbush et Falkow, 1979). Cependant, une telle expérience n'a jamais été faite sur le modèle aviaire.

1.5.2.5 Le sidérophore aérobactine

Tel que mentionné précédemment, la très faible concentration de fer libre dans les fluides physiologiques des animaux est nettement insuffisante pour permettre la croissance et la prolifération bactérienne (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003). C'est pourquoi, les souches pathogènes APEC ont développé des systèmes d'acquisition du fer, soit les sidérophores entérobactine et aérobactine. L'aérobactine est un sidérophore de type hydroxamate produit par les gènes *iucABCD*. Le gène *iutA* code pour le récepteur de l'aérobactine (Carbonetti et Williams, 1984; de Lorenzo *et al.*, 1986). Ces gènes ont été trouvés sur le plasmide de virulence pColV et ils confèrent à la bactérie *E. coli* la capacité de survivre sous stress ferrique, et ainsi participent à la virulence de la souche (Warner *et al.*, 1981; Williams, 1979). Toutefois, les gènes de synthèse et le récepteur de l'aérobactine ne sont pas exclusivement retrouvés sur le plasmide pColV, ils peuvent aussi être situés sur le chromosome bactérien (Valvano et Crosa, 1984). Or, la présence et l'expression des gènes codant pour l'aérobactine sont associées à la virulence des souches APEC. Plusieurs

études ont en effet démontré la corrélation entre la septicémie aviaire et la présence du sidérophore (Delicato *et al.*, 2003; Dozois *et al.*, 1992; Emery *et al.*, 1992; Lafont *et al.*, 1987; Vidotto *et al.*, 1990). Il existe aussi une relation entre la présence de l'aérobactine et la haute virulence des souches APEC, déterminée par LD₅₀ sur des poussins d'un jour (Lafont *et al.*, 1987). Néanmoins, dans une étude récente, Dozois et ses collaborateurs ont démontré qu'une souche mutante au niveau des gènes *tsh*, *iucABCD* et *iutA* peut établir une infection chez les poulets âgés de trois semaines. Ces infections ne sont toutefois pas aussi intenses que celles occasionnées par la souche sauvage (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). Ainsi, le sidérophore aérobactine participe à la virulence des souches APEC.

Bien que l'aérobactine participe à la virulence des souches pathogènes, il n'en reste pas moins qu'il possède une constante d'affinité pour le fer très inférieure à celle de l'entérobactine. Cependant, l'entérobactine, ne semble pas jouer un rôle important pour la virulence des souches de *E. coli* pathogènes (Williams et Carbonetti, 1986). C'est pourquoi, la présence des deux sidérophores, chez plusieurs bactéries pathogènes, a suscité un questionnement quant à leur utilité respective. Nombreuses explications ont été proposées. Tout d'abord, il semblerait que la concentration nécessaire d'aérobactine soit de 500 fois plus basse que celle de l'entérobactine requise pour stimuler efficacement la croissance bactérienne. Cette propriété a été attribuée à la capacité de réutilisation de l'aérobactine, contrairement à l'entérobactine qui est irrécupérable (Williams et Carbonetti, 1986). De plus, l'activité de l'entérobactine, est diminuée significativement en présence de sérum humain et d'albumine, ce qui n'est pas le cas pour l'aérobactine (Brock *et al.*, 1991; Williams et Carbonetti, 1986). Par ailleurs, il a été démontré que les deux sidérophores acquièrent les ions ferriques de sources différentes. En effet, l'entérobactine séquestre le fer à partir de la transferrine, tandis que l'aérobactine acquiert l'ion directement des cellules ou des tissus (Brock *et al.*, 1991). Cette dernière découverte vient appuyer la relation entre la production de l'aérobactine et la capacité d'invasion des souches de *E. coli* pathogènes. En outre, une différence dans la sécrétion des sidérophores pourrait aussi expliquer la meilleure efficacité de l'aérobactine *in vivo*. Une étude a démontré qu'en condition de stress ferrique, l'aérobactine est rapidement sécrétée, tandis que l'entérobactine semble s'accumuler au niveau du périplasme pour ensuite être relâchée

dans le milieu externe (Der Vartanian, 1988). En somme, toutes ces différences mettent en lumière l'importance de la production de l'aérobactine lors d'une infection bactérienne.

1.5.2.6 L'antigène capsulaire K

Les capsules ont la propriété de protéger les bactéries pathogènes contre les défenses non spécifiques de l'hôte (Jann et Jann, 1997). La capsule K1 est composée d'acides polysialiques situés à la surface externe des bactéries et elle est associée aux infections extra-intestinales (Gross, 1994; Muhldorfer et Hacker, 1994). La composition de cette capsule est d'ailleurs identique à celle de *Neisseria meningitidis*. En plus, les gènes *kps* sont responsables de la synthèse des capsules, or ils sont absents du génome de *E. coli* K-12 qui ne possède pas de capsule (Muhldorfer et Hacker, 1994). K1 est aussi faiblement immunogène, ce qui confère une résistance aux APEC face aux défenses immunitaires des oiseaux (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999). De plus, la présence de la capsule K1 chez les souches pathogènes augmente la résistance au complément du sérum et la colonisation des organes internes des poulets infectés (Mellata *et al.*, 2003a). Aussi, la capsule K1 participe initialement à l'évitement de la phagocytose, mais ne protège pas subséquentement contre les effets bactéricides des phagocytes (Mellata *et al.*, 2003b). L'antigène capsulaire K1 est fréquemment retrouvé à la surface des souches APEC de sérogroupes O1 et O2, tandis que l'antigène capsulaire K80 s'associe souvent avec le séro groupe O78 (Bree, Dho et Lafont, 1989; Gross, 1994). En somme, la capsule K1 est un déterminant de virulence important pour les souches de *E. coli* pathogènes pour les espèces aviaires.

1.5.2.7 Tsh : l'hémagglutinine thermosensible

L'hémagglutinine thermosensible est un autotransporteur codé par le gène *tsh*. Les autotransporteurs sont des protéines sécrétées impliquées dans la virulence des souches APEC et d'autres souches de *E. coli* pathogènes (Parreira et Gyles, 2003). Le gène *tsh* a été découvert chez la souche de *Escherichia coli* pathogène aviaire χ 7122. Tsh est composé de trois domaines, un domaine sécrété de 106 kDa qui est exporté par le domaine de 33 kDa constitué de feuillets bêta. Le troisième domaine est un domaine protéolytique dont le substrat est la caséine (Kostakioti et Stathopoulos, 2004). De plus, Tsh est

identique à la protéine Hbp qui possède la capacité de dégrader l'hémoglobine humaine, de se lier à l'hème en plus d'être impliquée dans la formation d'abcès chez le modèle d'infection murin (Otto *et al.*, 2002). Purifié, Tsh peut adhérer aux globules rouges du sang, à l'hémoglobine, à la fibronectine et au collagène IV (Kostakioti et Stathopoulos, 2004). Cloné chez une souche de *E. coli* K-12, Tsh confère la capacité d'agglutiner les érythrocytes de poulets (Provence et Curtiss, 1994). Généralement, les hémagglutinines sont exprimés à une température avoisinant les 37 °C. Cependant, l'expression et l'activité d'agglutination de Tsh sont augmentées lorsque la souche K-12 est cultivée à 26°C, sont faibles à 37 °C et sont réprimées à 42 °C, expliquant ainsi l'appellation thermosensible (Provence et Curtiss, 1994). Or, cette corrélation entre la sécrétion et l'activité d'agglutination selon la température n'existe pas chez la souche sauvage χ 7122. Contrairement à la souche K-12, la sécrétion de Tsh augmente à haute température, mais l'activité demeure meilleure à basse température. Les différences entre les deux phénotypes peuvent s'expliquer par une régulation dissemblable de l'expression de Tsh chez les deux souches ou par la présence d'autres hémagglutinines chez la souche sauvage χ 7122 (Stathopoulos, Provence et Curtiss, 1999). D'ailleurs, une mutation au niveau du gène chez la souche sauvage χ 7122 ne permet pas l'abolition du phénotype d'agglutination, suggérant ainsi la présence probable d'autres hémagglutinines, tel que les fimbriae curli, chez cette souche (Brown *et al.*, 2001; Provence et Curtiss, 1994).

Par la suite, plusieurs études ont tenté de démontrer l'importance de Tsh pour la virulence des souches APEC. Premièrement, il a été démontré parmi 300 souches APEC que Tsh est fréquemment localisé sur le plasmide de virulence pColV et que 90,6 % des isolats APEC hautement virulents portent le gène *tsh* (Dozois *et al.*, 2000). Ensuite, la détection du gène fut significativement plus élevée chez des souches provenant de colibacilloses aviaires (Delicato *et al.*, 2003). Finalement, des infections de poulets avec la souche sauvage *tsh* ont démontré que Tsh contribue aux développements des lésions au niveau des sacs aériens des animaux, mais n'est pas requis pour l'infection systémique. Donc, chez certaines souches APEC, Tsh est probablement requis pour les premières étapes de l'infection bactérienne responsables de la colisepticémie aviaire (Dozois *et al.*, 2000).

1.5.2.8 L'autotransporteur Vat

Récemment, un nouvel autotransporteur, Vat, a été identifié. Vat est une toxine autosécrétée et produite par une souche APEC qui induit la formation de vacuoles dans le cytoplasme des cellules eucaryotes CEF (« chick embryonic fibroblasts »). De plus, cette toxine est homologue à 75 % à Tsh et sa mutation inhibe la virulence de la bactérie dans les modèles d'infections respiratoires et de cellulites aviaires (Parreira et Gyles, 2003). Par ailleurs, sa grande homologie avec Tsh a causé une erreur de nomenclature par Heimer et ses collaborateurs qui ont nommé Tsh l'autotransporteur exprimé dans l'urine de souris infectées par la souche UPEC CFT073. Or, l'autotransporteur en question est Vat. Néanmoins, ils ont retrouvé *vat* chez 63 % des isolats cliniques UPEC et seulement chez 33 % des souches fécales, ce qui suggère un rôle probable dans la virulence des souches UPEC (Heimer *et al.*, 2004).

1.5.2.9 La résistance au sérum

La résistance au complément présent dans le sérum des oiseaux est une caractéristique associée aux souches APEC responsables de la colibacillose aviaire. En effet, plusieurs groupes de recherche ont démontré la relation entre la résistance au sérum et la virulence des souches APEC. La relation inverse a été aussi démontrée, soit la sensibilité au sérum et l'avirulence des souches (Ellis, Arp et Lamont, 1988; Vidotto *et al.*, 1990; Wooley *et al.*, 1992). De plus, la résistance au sérum est associée à la présence du plasmide de virulence pColV et/ou du plasmide codant pour le sidérophore aérobactine (Nolan *et al.*, 2003). Toutefois, il a été démontré que l'introduction du plasmide pAPEC-1, plasmide de type pColV, dans une souche *E. coli* K-12 augmente la résistance au sérum, mais que la perte de ce plasmide dans la souche APEC χ 7122 n'affecte pas sa résistance (Dozois *et al.*, 2000). Par ailleurs, les gènes *iss*, *traT* et *ompA* codent pour des protéines de la membrane externe et semblent être aussi impliqués dans la résistance au sérum. Les gènes *iss* et *traT* sont d'ailleurs souvent localisés sur des plasmides pColV. Cependant, le mécanisme d'action de la résistance au sérum par ces protéines est présentement inconnu (Nolan *et al.*, 2003).

À ce jour, il a été démontré que seuls le lipopolysaccharide O78 et la capsule K1 participent à la résistance au sérum, excluant ainsi le rôle de plusieurs facteurs de virulence, tels que les fimbriae P, type 1 et curli, soupçonnés a priori de participer à cette résistance (Mellata *et al.*, 2003a).

1.5.2.10 La survie et la résistance aux macrophages

Les souches APEC possèdent plusieurs facteurs de virulence qui interagissent avec les cellules immunitaires des animaux lors d'une infection. Leur survie au sein de l'organisme dépend donc sur leur capacité à résister à la phagocytose. Pourbakhsh et ses collaborateurs ont démontré que les souches APEC hautement pathogéniques sont plus aptes à envahir l'hôte et sont souvent à l'intérieur ou associées aux phagocytes des sacs aériens et des poumons. De plus, ces souches hautement pathogéniques résistent plus facilement à l'élimination *in vitro* par les macrophages des poulets en comparaison avec des souches de faible pathogénie (Pourbakhsh *et al.*, 1997b). Plusieurs facteurs de virulence exprimés par ces souches hautement pathogènes sont responsables de cette résistance. Tout d'abord, l'expression des fimbriae type 1 aide l'interaction entre les bactéries et les hétérophiles et les macrophages de poulets. Toutefois, ces fimbriae protègent subséquentement la bactérie contre les effets bactéricides de ces phagocytes (Mellata *et al.*, 2003b). En plus, la capsule K1, les fimbriae P et l'antigène O78 jouent un rôle important dans l'évitement initial de la phagocytose. Or, lorsque l'association entre les phagocytes et les bactéries a eu lieu, seuls les fimbriae P et l'antigène O78 semblent être impliqués dans la protection contre leurs effets bactéricides (Mellata *et al.*, 2003b).

1.5.2.11 Les toxines et les hémolysines

Peu d'études ont démontré à ce jour la relation entre la production de toxines et d'hémolysines et la virulence des souches APEC. Emery et ses collaborateurs ont publié une étude qui mentionne que parmi 500 souches APEC, seulement 66 produisaient la toxine thermolabile (LT) cytotoxique pour les cellules Vero. De plus, aucun de ces isolats ne produisait d'hémolysines ou de toxine thermostable (Emery *et al.*, 1992). Par la suite, Blanco et ses collaborateurs ont trouvé que seulement 7 % des 625 souches de *E. coli*

étaient toxigéniques (Blanco *et al.*, 1997). Néanmoins, Parreira et Gyles ont démontré que la toxine Vat, responsable de la formation intracellulaire de vacuoles, possède des propriétés cytotoxiques similaires à celles causées par la toxine VacA de *Helicobacter pylori*. De plus, ils ont prouvé que la production de cette toxine est importante pour l'établissement de l'infection de la souche *E. coli* Ec222 dans le modèle d'infection respiratoire et de la cellulite aviaire (Parreira et Gyles, 2003).

Par ailleurs, l'hémolysine a d'abord été identifiée comme étant un facteur de virulence (Minschew *et al.*, 1978), cependant la découverte de l'aérobactine comme mécanisme d'acquisition du fer a redéfini le rôle de l'hémolysine en tant que mécanisme alternatif d'acquisition du fer en absence des gènes aérobactine (Opal *et al.*, 1990). En bref, le rôle de l'hémolysine et des toxines, sauf la toxine Vat, pour la virulence des souches APEC est vraisemblablement de faible importance. Or, d'autres toxines, actuellement inconnues, restent peut-être à découvrir.

1.5.3 Les facteurs de virulence APEC retrouvés chez les ExPEC

Plusieurs des facteurs de virulence associés aux souches APEC sont aussi responsables de maladies causées par les souches de *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC). Chez les souches de *E. coli* causant des infections du tractus urinaire, les facteurs de virulence communs aux APEC sont la production de fimbriae de type 1, P et curli, la sécrétion de l'aérobactine et la présence d'une capsule à la surface de la bactérie (Emody, Kerényi et Nagy, 2003; Oelschlaeger, Dobrindt et Hacker, 2002). Évidemment, plusieurs autres facteurs sont aussi en cause.

1.6 L'importance du fer dans les différents processus biologiques

Le fer est le quatrième élément le plus abondant sur la Terre, l'oxygène, le silicium et l'aluminium étant les trois premiers, et il est absolument essentiel à la vie pour une très grande majorité d'organismes (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003). Ce métal participe à plusieurs processus biologiques, tels que la photosynthèse, la méthanogenèse, la fixation de l'azote, le cycle de l'acide trichloracétique, la production et la consommation de l'hydrogène, la respiration, le transport de l'oxygène, ainsi que la régulation et la biosynthèse de l'ADN (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; McHugh *et al.*, 2003). Le fer peut exister sous deux formes, soit sous la forme réduite Fe^{2+} ou fer ferreux, soit sous sa forme oxydée Fe^{3+} ou fer ferrique (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Faraldo-Gomez et Sansom, 2003).

Cependant, sous des conditions physiologiques, le fer ferrique (Fe^{3+}) se retrouve de façon prédominante, mais il est aussi extrêmement insoluble sous cette forme (10^{-18} M à pH 7,0) (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003). De plus, le fer devient extrêmement toxique en présence d'oxygène (Braun et Braun, 2002a).

Cette toxicité s'explique par une série de réactions chimiques. Tout débute lorsque des molécules d'oxygène O_2 acceptent un électron et forment le radical superoxide O_2^- . En ajoutant un deuxième électron à ce superoxide, un ion peroxyde O_2^{2-} est produit. Cet ion n'est pas un radical et n'est pas toxique. Cependant à pH physiologique, il y a protonation spontanée de l'ion peroxyde, ce qui résulte en la production de peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et d'oxygène O_2 . La réaction s'écrit comme suit :



Il a été trouvé, à maintes reprises, que le radical superoxide et le peroxyde d'hydrogène sont produits par des voies métaboliques normales de plusieurs systèmes biologiques (Griffiths, 1999). Toutefois, la réaction se complique lorsque le peroxyde d'hydrogène rencontre le fer ferreux Fe^{2+} . En fait, le mélange de ces deux réactifs produit spontanément

un radical OH• et l'oxydation de Fe²⁺ en Fe³⁺. Cette réaction, mieux connue sous le nom de réaction de Fenton, s'écrit comme suit :



Une autre réaction peut avoir lieu s'il y a rencontre du radical superoxyde O₂⁻ et le peroxyde d'hydrogène H₂O₂ (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003). C'est la réaction de Haber – Weiss qui mènera à la formation du radical hydroxyle OH•:



Le radical hydroxyle OH• est de loin le plus toxique. En fait, il réagit fortement avec plusieurs molécules organiques cellulaires, telle que les membranes cellulaires et l'ADN et cause leurs destructions (Griffiths, 1999). Ainsi, dans un environnement aérobique, la rareté du fer ferrique est due à son insolubilité et à sa toxicité en présence d'oxygène (Braun et Braun, 2002b). Il est donc primordial pour un organisme de séquestrer le fer de façon contrôlable, et ce, afin d'éviter la formation du radical hydroxyle OH• (Griffiths, 1999).

1.7 Les protéines liant le fer chez les humains et les animaux

Chez les humains et les animaux, une très grande quantité de fer se retrouve complexée à des protéines de haute affinité pour le fer. Certaines protéines font partie de la famille des transferrines, qui sont des glycoprotéines monomériques extracellulaires, ayant un poids moléculaire d'environ 80 kDa (Ratledge et Dover, 2000). Cette famille regroupe trois membres, soit la transferrine, la lactoferrine, et l'ovotransferrine. La transferrine se retrouve dans le sérum et la lymphe, tandis que la lactoferrine est retrouvée dans le lait, la salive et les larmes (Benjamin *et al.*, 1985). Quant à l'ovotransferrine ou la conalbumine, elle est retrouvée dans les blancs d'œufs des oiseaux (Schade A L, 1944). Il a été démontré que ces protéines ont une constante d'affinité avec le fer d'environ 10³⁶, en plus de n'être généralement qu'en partie saturées. Par exemple, dans le sérum humain, la transferrine

n'est saturée qu'entre 30 à 40 %, ce qui est crucial pour assurer une constante séquestration du fer pouvant se retrouver momentanément libre dans l'organisme (Bullen *et al.*, 2000; Litwin et Calderwood, 1993; Ratledge et Dover, 2000).

De plus, il existe une protéine intracellulaire d'entreposage du fer, la ferritine, retrouvée à travers le règne animal, végétal et bactérien (Harrison et Arosio, 1996). Cette protéine est composée de 24 sous-unités formant une sphère pouvant lier jusqu'à 4500 atomes de Fe^{3+} (Harrison et Arosio, 1996; Hentze, Muckenthaler et Andrews, 2004; Ratledge et Dover, 2000). Il a été estimé à 13 % la quantité totale de fer entreposée dans les cellules par la ferritine et c'est dans la rate, le foie et la moelle osseuse que l'on retrouve la plus haute concentration de ferritine chez les humains et les animaux (Harrison et Arosio, 1996; Hentze, Muckenthaler et Andrews, 2004). Chez les bactéries, il existe une variante de la ferritine, la bactérioferritine, qui possède un hème, mais qui a une fonction similaire à la ferritine (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Ratledge et Dover, 2000).

De plus, d'autres protéines du corps humain, dont l'hème et l'hémoglobine, contiennent elles aussi du fer, mais ces protéines sont différentes des protéines séquestrant le fer, car elles ont besoin du fer pour accomplir leurs fonctions biologiques (Evans *et al.*, 1999).

Toutes ces protéines de haute affinité pour le fer font en sorte que la disponibilité du fer chez les humains et animaux est extrêmement faible. En effet, il a été calculé que l'équilibre entre le fer libre disponible et le fer complexé aux diverses protéines se situe au environ de 10^{-18} M (Litwin et Calderwood, 1993; Ratledge et Dover, 2000). Cependant, la quantité nécessaire d'ions ferriques par cellules bactériennes a été calculée aux environs de 10^5 à 10^6 , et ce, afin de maintenir une concentration interne entre 10^{-7} M à 10^{-5} M (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Braun et Braun, 2002b). Ainsi, lors d'une infection par une bactérie pathogène, la quantité de fer libre totale disponible est nettement insuffisante pour permettre à cette dernière d'assurer sa survie et sa prolifération dans l'organisme hôte (Benjamin *et al.*, 1985).

1.8 L'acquisition du fer chez la bactérie

Les microorganismes ont développé diverses stratégies pour obtenir le fer nécessaire à leurs survie et prolifération. Il existe en fait quatre stratégies possibles d'acquisition du fer par une bactérie (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Ratledge et Dover, 2000).

- 1- Synthèse de sidérophores et des systèmes d'acquisition et d'utilisation de ces sidérophores
- 2- Incorporation des protéines de l'hôte liant le fer par des récepteurs spécifiques.
- 3- Réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} et transport du fer ferreux.
- 4- Transporteur de métaux de type ABC

Les sidérophores sont de petites molécules de faible poids moléculaire qui possèdent une haute affinité pour le fer ferrique (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003). Ces petites molécules sont synthétisées par de nombreuses bactéries, levures, moisissures et plantes. À ce jour, plus de 500 sidérophores ont été découverts et la plupart d'entre eux se classent parmi trois groupes soit les catécholes, les hydroxycarboxylates et les hydroxamates. Le sidérophore entérobactine, sécrété par *Escherichia coli*, est le sidérophore de type catécholate le plus connu et le plus étudié. Le citrate représente bien les hydroxycarboxylates, tandis que le ferrichrome et l'aérobactine sont des sidérophores bien connus faisant partie du groupe des hydroxamates (Ferguson et Deisenhofer, 2002).

L'incorporation de la transferrine, de la lactoferrine, de l'hémoglobine et de l'hème directement par des récepteurs spécifiques situés à la surface de la membrane externe de la bactérie est une autre stratégie grandement utilisée par différentes bactéries. Par exemple, *Neisseria meningitidis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Haemophilus influenzae* possèdent des récepteurs spécifiques, TbpAB et LbpAB pour internaliser les complexes Fe^{3+} -transferrine

et Fe³⁺-lactoferrine respectivement (Clarke, Tari et Vogel, 2001; Faraldo-Gomez et Sansom, 2003; Ratledge et Dover, 2000). L'hème et l'hémoglobine peuvent être internalisés directement par certains récepteurs spécifiques. Cependant, l'hème et l'hémoglobine doivent être préalablement libérées des globules rouges. Ainsi, plusieurs bactéries pathogènes sécrètent des protéases et des hémolysines capables de lyser les cellules (Litwin et Calderwood, 1993). Par la suite, l'hème et l'hémoglobine peuvent être internalisés ou complexés avec d'autres protéines de l'hôte, telles que l'haptoglobine, l'hémopexine et l'albumine. *Haemophilus influenzae* peut également utiliser l'hémoglobine, l'hémoglobine-haptoglobine, l'hème-hémopexine et l'hème-albumine afin d'acquérir le fer nécessaire à sa croissance (Clarke, Tari et Vogel, 2001; Litwin et Calderwood, 1993). Par ailleurs, *Yersinia pestis*, bactérie responsable de la peste bubonique, internalise directement l'hème et le complexe hème-HasA via le système Hmu et le système Has respectivement, ce dernier étant également exploité par *Serratia marcescens* (Letoffe, Delepelaire et Wandersman, 2004; Rossi *et al.*, 2001). Finalement, la bactérie pathogène *E. coli* O157 utilise le récepteur ChuA pour acquérir l'hème (Clarke, Tari et Vogel, 2001).

Une autre stratégie d'obtention du fer est la réduction du fer ferrique en fer ferreux et le transport du fer ferreux. *Listeria monocytogenes*, bactérie Gram-négative, a la capacité de sécréter à sa surface une réductase qui a la fonction de réduire le fer ferrique de la transferrine en fer ferreux soluble (Coward et Foster, 1985). Par ailleurs, chez *E. coli*, le système de transport du fer ferreux Feo a été caractérisé. Ce système est codé par les gènes *feoAB* qui sont induits en anaérobiose et sous stress ferrique (Kammler, Schon et Hantke, 1993). De plus, la mutation de *feoB* chez *E. coli* et *Salmonella* atténue leur capacité à coloniser l'intestin des souris, mais n'affecte pas la virulence de ces souches (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003).

Finalement, la dernière stratégie d'acquisition du fer se fait par les transporteurs de métaux de type ABC. Plusieurs transporteurs sont connus tels que les systèmes SfuABC, SitABC, YfeABC, FbpABC et FutABC. Ces systèmes se retrouvent chez plusieurs bactéries, soit *Serratia marcescens*, *Salmonella typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae* et *Synechocystis* PCC 6803. Ces derniers transportent préférentiellement des ions métalliques

divalents, notamment Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003).

1.9 L'entérobactine

L'entérobactine est le sidérophore endogène de haute affinité pour le fer produit par plusieurs entérobactéries dont *Escherichia coli*, *Salmonella* et *Klebsiella* (Crosa et Walsh, 2002). La découverte de l'entérobactine a été faite en 1970 par deux groupes de chercheurs. Tout d'abord, O'Brien et Gibson ont isolé la molécule chez *Escherichia coli* qu'ils ont nommé entérocheline (O'Brien et Gibson, 1970) et ensuite Pollack et Neilands ont baptisé entérobactine la même molécule retrouvée chez *Salmonella typhimurium* (Pollack et Neilands, 1970). Bien que O'Brien et Gibson aient soumis l'article les premiers, ce fut le papier de Pollack et Neilands qui fut imprimé en premier, résultant en une utilisation courante des deux noms pour le même sidérophore (Raymond, Dertz et Kim, 2003).

L'entérobactine (Ent) est un sidérophore de type catécholates sécrété par la bactérie en réponse à un stress ferrique (Gehring, Mori et Walsh, 1998). La structure moléculaire de l'entérobactine est constituée de trois unités de 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS) liées entre elles par des liaisons esters, ce qui confère une forme cyclique à la molécule. Ainsi cyclisé, le sidérophore peut lier un atome de fer ferrique par ses trois groupes catécholates (figure 1.1) (Earhart, 1987).

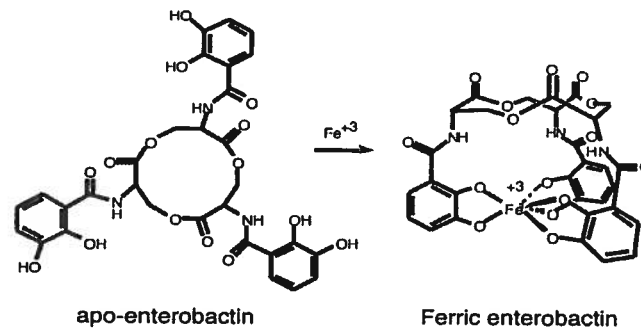


Figure 1.1 : Structure de l'entérobactine et du complexe ferri-entérobactine (Crosa et Walsh, 2002).

La biosynthèse et le transport de l'entérobactine sont codés par une grande région de 22 kb située à 13 minutes sur le chromosome de *E. coli*. Les 14 gènes de biosynthèse et de transport, soit *entD*, *fepA*, *fes*, *entF*, *fepE*, *fepC*, *fepG*, *fepD*, *fepB*, *entS*, *entC*, *entE*, *entB* et *entA*, se situent dans cette région de 22 kb (Crosa et Walsh, 2002).

La biosynthèse de l'entérobactine se fait en deux parties et nécessite l'apport de six gènes (Ozenberger, Brickman et McIntosh, 1989). Tout d'abord, l'acide shikimique est converti en chorismate suite à trois réactions enzymatiques (Roberts *et al.*, 2002). Le chorismate est ensuite isomérisé en isochorismate par EntC, qui est une isochorismate synthétase (Liu, Duncan et Walsh, 1989; Liu *et al.*, 1990; Ozenberger, Brickman et McIntosh, 1989). EntB, une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate synthétase, enlève le groupement enolpyruvyl de l'isochorismate et le convertit en 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate (2,3-diDHB) (Ozenberger, Brickman et McIntosh, 1989; Sakaitani *et al.*, 1990). Finalement, le 2,3-diDHB est oxydé par l'action de EntA, qui est une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate déshydrogénase, produisant ainsi du 2,3-dihydroxybenzoate (2,3-DHB). (Liu, Duncan et Walsh, 1989; Sakaitani *et al.*, 1990). Cette dernière réaction est NAD⁺ dépendante (Sakaitani *et al.*, 1990). (figure 1.2)

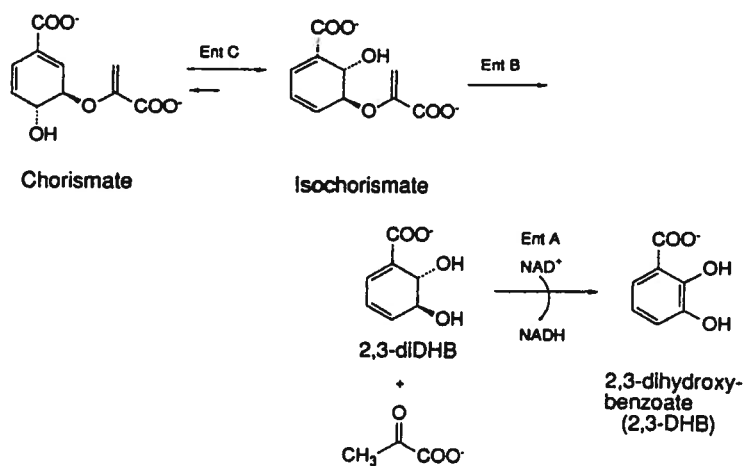


Figure 1.2 : Biosynthèse du 2,3-DHB à partir du chorismate (Sakaitani *et al.*, 1990).

La deuxième phase de biosynthèse de l'entérobactine nécessite l'apport de quatre gènes, *entB*, *entD*, *entE* et *entF*. Tous ces gènes, à l'exception de *entD*, codent pour des enzymes de types « non-ribosomal peptide synthetases » (NRPS) (figure 1.3) (Crosa et Walsh, 2002). Les NRPS sont des enzymes composés de plusieurs domaines enzymatiques de

fonctions spécifiques qui produisent des peptides sans une matrice ARN (Crosa et Walsh, 2002; Ehmann *et al.*, 2000; Marshall *et al.*, 2002). Généralement, les domaines nécessaires au fonctionnement du système sont la condensation (C), l'adénylation (A), la protéine « peptidyl carrier » (PCP) et le domaine thioestérase (TE) (Roche et Walsh, 2003). Dans ce cas-ci, le produit du gène *entE* possède le domaine d'adénylation (A) (Ehmann *et al.*, 2000; Rusnak, Faraci et Walsh, 1989). EntB a été préalablement décrit comme étant une 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate synthétase, or il possède un deuxième domaine enzymatique soit le domaine PCP, aussi nommé ArCP (aryl carrier protein) (Gehring, Bradley et Walsh, 1997; Roche et Walsh, 2003). Finalement, le gène *entF* code pour une protéine de 142 KDa qui possède les quatre domaines mentionnés ci-haut (A-C-PCP-TE) (Crosa et Walsh, 2002; Roche et Walsh, 2003). Ainsi, ces trois enzymes constituent à elles seules le système NRPS (Crosa et Walsh, 2002).

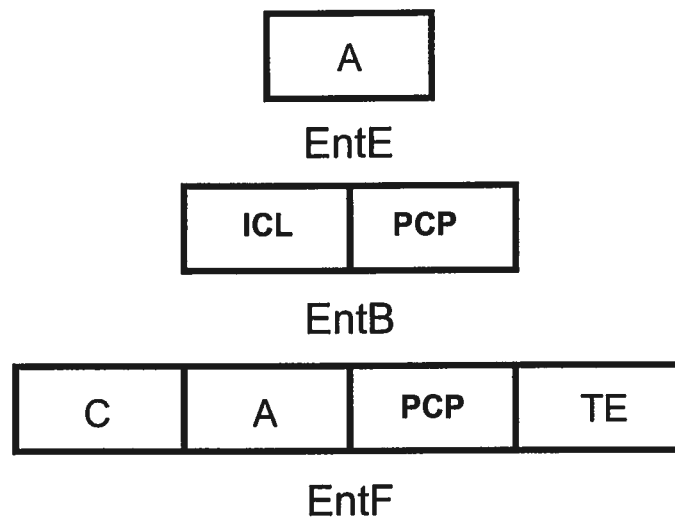


Figure 1.3 : Domaines A-C-PCP-TE des gènes *entE*, *entB* et *entF* constituant le système NRPS. Schéma adapté (Crosa et Walsh, 2002).

La biosynthèse de l'entérobactine a été préalablement décrite jusqu'à la production du 2,3-dihydroxybenzoate. Par la suite, une série de réactions enzymatiques très complexes mènera à la formation de la molécule d'entérobactine. Tout d'abord, le gène *entE* code pour une 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase et a pour rôle l'activation du 2,3-DHB, le convertissant en 2,3-DHB-AMP à l'aide d'une molécule d'ATP (figure 1.4) (Roche et Walsh, 2003; Rusnak, Faraci et Walsh, 1989).

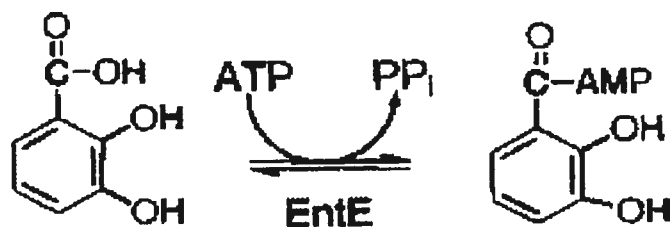


Figure 1.4 : Activation du 2,3-DHB par EntE à l'aide d'une molécule d'ATP (Gehring, Mori et Walsh, 1998).

Par ailleurs, le gène *entD*, codant pour une phosphopantetheinyl transférase (Ppant), catalyse la réaction posttranscriptionnelle du transfert de la partie phosphopantetheinyl du coenzyme A sur la sérine de la chaîne latérale du domaine PCP de EntB et EntF (figure 1.5) (Gehring, Bradley et Walsh, 1997; Gehring, Mori et Walsh, 1998). Dans cette réaction, les enzymes EntB et EntF passeront de la forme apo à holo (Gehring, Bradley et Walsh, 1997).

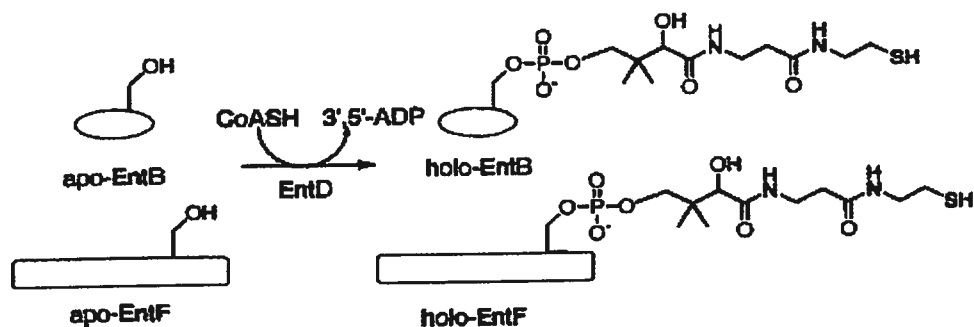


Figure 1.5 : Réaction posttranscriptionnelle du transfert de la partie phosphopantetheinyl du coenzyme A sur la sérine de la chaîne latérale du domaine PCP de EntB et EntF par EntD. (Gehring, Mori et Walsh, 1998)

Le domaine PCP de EntB ainsi activé recevra la molécule de 2,3-DHB également activé grâce à l'action du domaine d'adénylation de EntE (figure 1.6, réaction # 2) Cette dernière réaction mènera à la formation de l'intermédiaire 2,3-DHB-S-EntB (Roche et Walsh, 2003). Par ailleurs, le domaine PCP activé de EntF accueillera une sérine, réaction catalysée par le domaine A de EntF et une molécule d'ATP (figure 1.6, réaction # 1). L'intermédiaire ainsi formé est Ser-S-EntF (Ehmann *et al.*, 2000; Roche et Walsh, 2003). Finalement, le domaine C de EntF catalysera la réaction de transfert de la molécule de 2,3-

DHB du domaine PCP de EntB à la sérine liée à la partie phosphopantetheinyl du domaine PCP de EntF. L'intermédiaire se nomme DHB-Ser-S-EntF (figure 1.6, réaction # 3) (Roche et Walsh, 2003).

Il a aussi été démontré que le gène *entF* est impliqué dans la synthèse de la microcine MccH47, qui est un peptide antibiotique produit par certaines souches Gram-négatives (Azpiroz et Lavina, 2004).

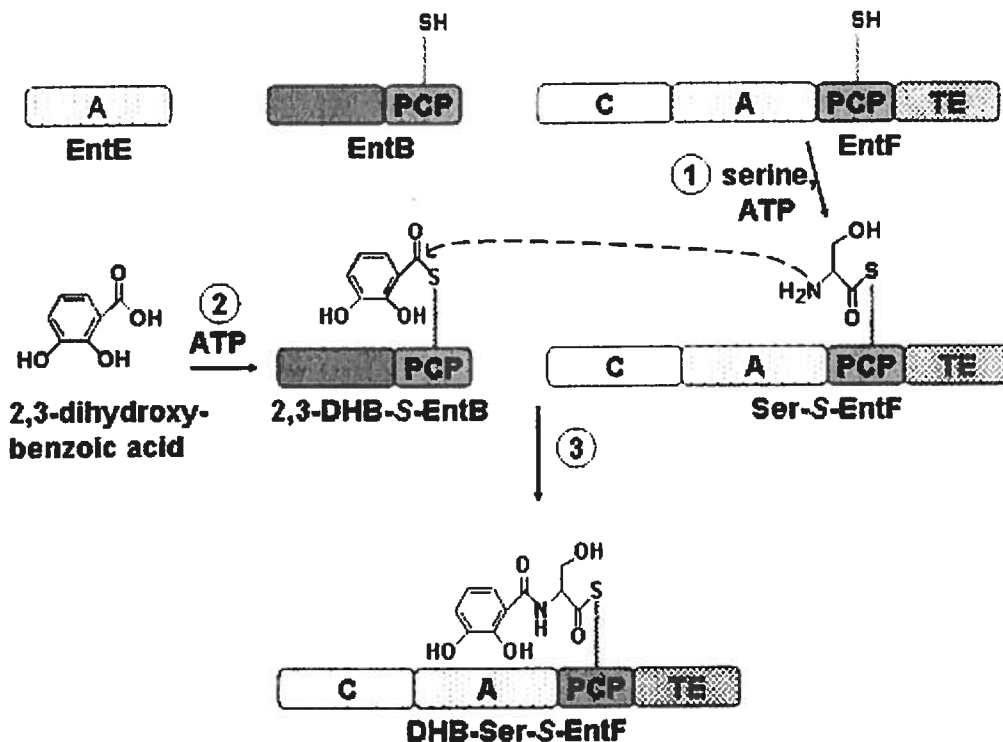


Figure 1.6 : Formation de l'intermédiaire DHB-Ser-S-EntF (Roche et Walsh, 2003).

L'étape finale d'assemblage de l'entérobactine consiste au transfert de la chaîne acyle DHB-Ser du domaine PCP de EntF au domaine TE de EntF (figure 1.7). Ce transfert est catalysé par le domaine TE de EntF d'où la chaîne acyle DHB-Ser se lie de façon covalente (Crosa et Walsh, 2002; Roche et Walsh, 2003). Ce transfert libérera donc le domaine PCP de EntF qui pourra à nouveau accueillir une molécule DHB-Ser, qui sera à nouveau transférée au domaine TE. Ces étapes de transfert et d'élongation prendra fin lorsque trois molécules de DHB-Ser se seront accumulées au domaine TE. Par la suite, il y aura

cyclisation des trois molécules DHB-Ser et ainsi formation de l'entérobactine cyclique (Crosa et Walsh, 2002; Ehmann *et al.*, 2000; Shaw-Reid *et al.*, 1999).

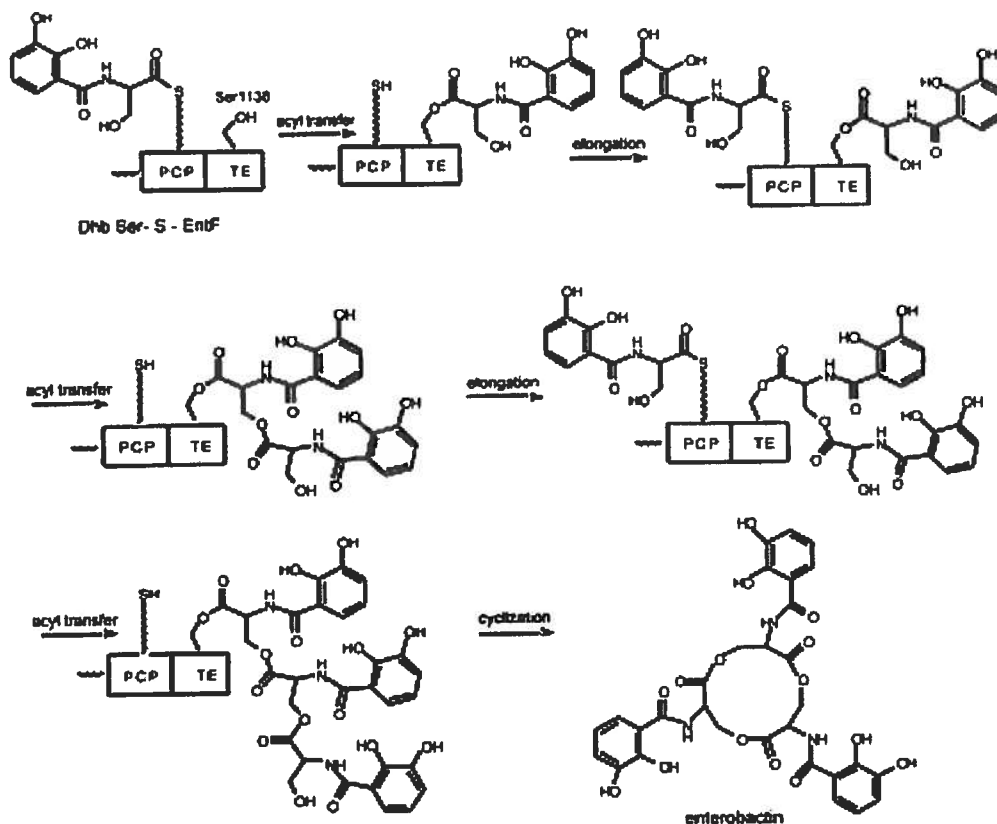


Figure 1.7 : Étape finale de la formation de l'entérobactine (Crosa et Walsh, 2002).

1.10 Le transport, la dégradation et la régulation de l'entérobactine

1.10.1 EntS: la protéine d'exportation de l'entérobactine

Lorsque la molécule d'entérobactine est synthétisée dans le cytoplasme de la bactérie, il y a exportation de celle-ci par une protéine transmembranaire EntS (figure 1.8) (Furrer *et al.*, 2002). La bactérie a besoin d'une protéine d'exportation de l'entérobactine, puisque la limite de taille d'une molécule pouvant diffuser passivement à travers les membranes est

d'environ 600 Da et que l'entérobactine fait 669 Da (Ecker, Matzanke et Raymond, 1986). Le gène *entS*, qui a été nommé en premier lieu *ybdA*, code pour cette protéine d'exportation, et il se situe en antisense du gène *fepB* et *fepD* (Crosa et Walsh, 2002). EntS est une protéine de 43 kDa possédant douze domaines hélicoïdaux transmembranaires (Furrer *et al.*, 2002). Une mutation dans le gène *entS* ne permet plus la sécrétion de la molécule d'entérobactine cyclisée. Cependant, le sidérophore ne s'accumule pas dans le cytoplasme de la bactérie, puisque l'estérase Fes dégrade le sidérophore en plusieurs molécules de DHBS monomérique, dimérique et trimérique, même si la molécule n'a jamais été sécrétée (Furrer *et al.*, 2002; O'Brien, Cox et Gibson, 1971). Les molécules de DHBS peuvent diffuser passivement à travers les membranes et ont la propriété de séquestrer le fer ferrique de l'environnement bactérien. Le DHBS est en fait un sidérophore faible, mais assez efficace pour nourrir la bactérie en fer (Hantke, 1990). Les complexes ferri-DHBS sont récupérés par les récepteurs FepA, Fiu et CirA présents à la surface externe de la bactérie (Hantke, 1990; Nikaido et Rosenberg, 1990).

1.10.2 La formation du complexe ferri-entérobactine

Lorsque la molécule d'entérobactine est sécrétée à l'extérieur de la bactérie, cette dernière séquestrera le fer ferrique de l'environnement de la bactérie. Il s'y formera ainsi le complexe ferri-entérobactine (Fe^{3+} -Ent). L'entérobactine est d'ailleurs un fort chélateur de fer, en effet il possède une constante d'affinité pour le fer ferrique de l'ordre de 10^{52} (Earhart, 1987; Harris *et al.*, 1979; Neilands, 1981). Aussi, des expériences *in vitro* ont démontré que l'entérobactine peut prendre les ions ferriques de la transferrine et de la lactoferrine (Brock *et al.*, 1983).

1.10.3 Le transporteur de type ABC

Par la suite, le complexe Fe^{3+} -Ent devra être internalisé dans le cytoplasme de la bactérie, afin que le fer accomplisse les divers processus biologiques nécessaires à la bonne croissance de la bactérie. Le transport du complexe ferri-entérobactine de la membrane externe jusqu'au cytoplasme bactérien nécessite l'apport d'un transporteur de type ABC,

puisque le complexe est de trop grande taille pour la diffusion passive (Postle et Kadner, 2003). Typiquement, un transporteur de type ABC possède trois composantes : un récepteur situé sur la membrane externe, une protéine périplasmique et un complexe de un ou deux protéines membranaires cytoplasmiques associées avec une cassette de liaison à l'ATP (Ferguson et Deisenhofer, 2002). Dans ce cas-ci, le transporteur de type ABC est codé par les gènes *fepABCDG* (Ozenberger, Nahlik et McIntosh, 1987).

1.10.4 Le récepteur FepA

Tout d'abord, le gène *fepA* code pour un récepteur de la membrane externe, FepA, qui a la capacité de lier le complexe ferri-entérobactine (figure 1.8). FepA, une protéine de 81 kDa TonB-dépendante, est en fait constituée de deux domaines. Le premier domaine transmembranaire est formé de 22 feuilletts bêta antiparallèles organisés spatialement en forme de barril (Ferguson et Deisenhofer, 2002; Pierce et Earhart, 1986). De plus, le récepteur possède un « plug domaine » en N-terminal composé d'un mélange de 4 feuilletts bêta, de courtes hélices alpha et de boucles (Ferguson et Deisenhofer, 2002; Raymond, Dertz et Kim, 2003). Une mutation chez *E. coli* K-12 dans le gène *fepA* abolit le transport du complexe ferri-entérobactine vers le périplasma bactérien (Winkelmann *et al.*, 1994). En plus, le récepteur agit sous l'action de la force protomotrice générée par le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD (Higgs, Larsen et Postle, 2002). Aussi, le récepteur FepA reconnaît et lie d'autres substrats, tels que les colicines B et D et des analogues synthétiques de l'entérobactine TRENAM et MECAM (Ecker, Matzanke et Raymond, 1986; Heidinger *et al.*, 1983; Rutz *et al.*, 1992; Thulasiraman *et al.*, 1998).

1.10.5 Le complexe TonB-ExbB-ExbD

Le complexe TonB-ExbB-ExbD procure l'énergie nécessaire à la translocalisation périplasmique du complexe ferri-entérobactine capté par le récepteur FepA (figure 1.8). Plusieurs évidences démontrent que la protéine TonB énergisée interagit avec le récepteur FepA et lui transmet son énergie, ce qui mène à un changement de conformation du récepteur (Higgs, Myers et Postle, 1998). Ce changement de conformation permet ensuite

à la translocalisation au niveau du périplasma du sidérophore chargé. De plus, la présence du complexe ferri-entérobactine augmente grandement l'interaction entre TonB et FepA (Higgs *et al.*, 2002). Par ailleurs, les protéines ExbB et ExbD ont pour fonction d'utiliser la force protomotrice de la membrane cytoplasmique et de la transmettre à la protéine TonB. Autrement dit, ExbB et ExbD fournissent l'énergie nécessaire à TonB, qui lui fait la navette jusqu'à FepA (Letain et Postle, 1997; Postle et Kadner, 2003). Une mutation de ces protéines peut être complétée seulement à 10 % par des protéines homologues TolQ et TolR (Letain et Postle, 1997). De plus, la proportion de ces protéines, constituant le système de transduction d'énergie, est d'une protéine TonB, deux protéines ExbD et sept protéines ExbB (Higgs, Larsen et Postle, 2002). Enfin, il a été démontré que ExbD possédait plusieurs domaines logés du côté périplasmique et que ExbB se situait plutôt du côté cytoplasmique de la membrane interne (Higgs, Myers et Postle, 1998).

Par ailleurs, Torres et ses collaborateurs ont publié une étude portant sur les systèmes dépendant de TonB. Ils ont démontré que l'incorporation de l'aérobactine, l'entérobactine et de l'hème requièrent le système TonB. De plus, leurs résultats indiquent que TonB est nécessaire à la virulence de la souche *Escherichia coli* CFT073 uropathogène chez le modèle murin d'infection du tractus urinaire (Torres *et al.*, 2001). De plus, chez *Salmonella typhi*, la présence de TonB est requise pour sa survie dans les monocytes humains de la lignée cellulaire Mono Mac 6 (Gorbacheva *et al.*, 2001). Toutefois, dans une étude de Tsois et ses collaborateurs, il a été démontré qu'une mutation du gène *tonB* atténue la souche *S. typhimurium* pour la colonisation des plaques de Peyer et les ganglions mésentériques, mais n'affecte pas l'infection du foie et de la rate chez le modèle d'infection murin (Tsois *et al.*, 1996). La contribution de TonB à l'incorporation de complexes ferri-sidérophores, fait de ce dernier un déterminant important pour la virulence des souches pathogènes.

1.10.6 La protéine FepB

Lorsque la translocalisation du complexe ferri-entérobactine au niveau du périplasme a eu lieu, ce dernier va se lier à la protéine périplasmique FepB (figure 1.8) (Stephens, Choe et Earhart, 1995). La protéine FepB possède une très haute affinité pour le complexe ferri-entérobactine, ce qui explique sa liaison (Sprenzel *et al.*, 2000). FepB est une protéine de 33,8 kDa qui sert de navette périplasmique entre le récepteur FepA et les protéines transmembranaires FepCDG (Sprenzel *et al.*, 2000). La fonction de FepB est donc de livrer le complexe ferri-entérobactine au complexe transmembranaires FepCDG (Stephens, Choe et Earhart, 1995).

1.10.7 Le complexe FepCDG

L'étape finale de translocalisation du complexe ferri-entérobactine du périplasme au cytoplasme nécessite l'apport des protéines transmembranaires FepCDG localisées dans la membrane interne de la bactérie (figure 1.8) (Sprenzel *et al.*, 2000). Tout d'abord, FepC est une protéine associée à la membrane interne et possède un site de liaison de l'ATP (Chenault et Earhart, 1992). FepD et FepG sont deux protéines hydrophobes membres de la familles des perméases (Chenault et Earhart, 1992). FepD et FepG forment en fait le pore dans la membrane interne avec l'aide de deux protéines FepC (Chenault et Earhart, 1992).

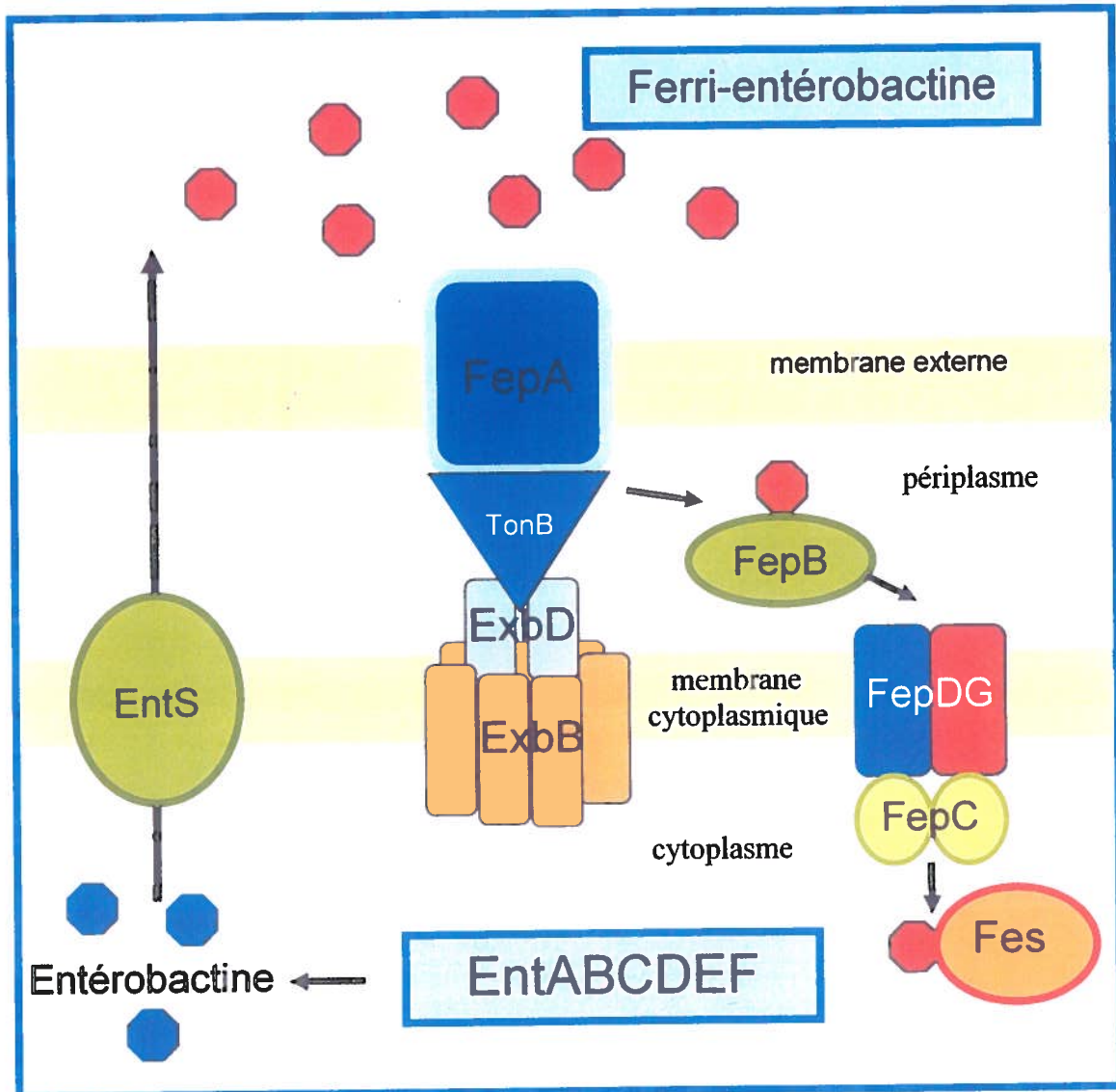


Figure 1.8 : Schéma du système de transport et d'utilisation de l'entérobactine.

1.10.8 La dégradation de l'entérobactine par Fes

Lorsque le complexe ferri-entérobactine est internalisé dans le cytoplasme bactérien, une enzyme, Fes, brisera les liens esters du complexe et libérera ainsi le fer ferrique (figure 1.8). Fes est une estérase de 43 kDa qui reconnaît les trois liens esters de la molécule ferri-entérobactine (Brickman et McIntosh, 1992). Ainsi, il existe trois formes de produits de dégradation de l'entérobactine, soit le monomère, le dimère et le trimère de DHBS (figure 1.9) (O'Brien, Cox et Gibson, 1971; Winkelmann *et al.*, 1994). Par ailleurs, Fes reconnaît l'entérobactine non lié à un ion ferrique. En fait, Fes hydrolyse plus vite l'entérobactine

seule que le complexe ferri-entérobactine, empêchant ainsi l'accumulation intracellulaire d'entérobactine (Greenwood et Luke, 1978; Langman *et al.*, 1972). Il a été également rapporté que Fes posséderait une activité réductase qui réduirait le fer ferrique en fer ferreux beaucoup plus soluble et de plus faible affinité pour le sidérophore. Ainsi, l'ion ferreux se dissocierait de l'entérobactine (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Heidinger *et al.*, 1983).

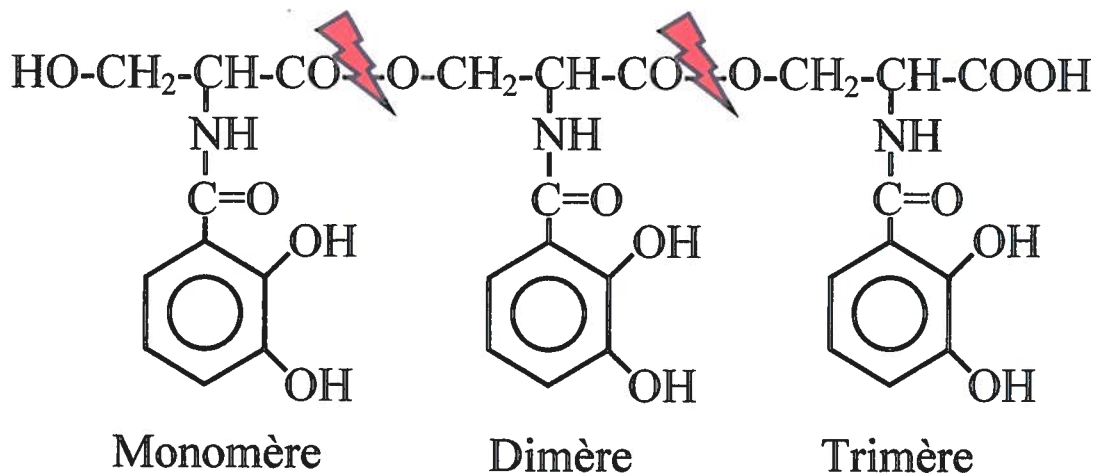


Figure 1.9 : Produits de dégradation de l'entérobactine par l'estérase Fes.

1.10.9 La régulation de l'entérobactine

La régulation de la synthèse de l'entérobactine se fait par la protéine Fur (Ferric-uptake regulator). Fur est une protéine de 17 kDa synthétisée à partir du gène *fur* qui est localisé à 15,7 min sur le chromosome de *E. coli* (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003; Hunt, Pettis et McIntosh, 1994). Fur joue le rôle de répresseur en milieu riche en fer. En effet, dans ces conditions, Fur se lie au fer ferreux et inhibe la transcription des gènes reliés à la réponse au stress ferrique, notamment ceux de l'entérobactine (Lavrrar et McIntosh, 2003). Cette inhibition se fait par la reconnaissance d'une séquence consensus de 19 pb, appelé boîte Fur, où le complexe Fe^{2+} -Fur va se lier pour empêcher la transcription des gènes. La boîte Fur se situe généralement au niveau du promoteur des gènes entre les sites -35 et -10 (Andrews, Robinson et Rodriguez-Quinones, 2003). Une séquence consensus,

qui reconnaît le complexe Fe^{2+} -Fur, a été déterminée de Lorenzo et ses collaborateurs (de Lorenzo *et al.*, 1987), et est composée de la séquence suivante :

GATATTGATAATCATTATC
CTATAACTATTAGTAATAG

Par ailleurs, la région de 22 kb codant pour le système de l'entérobactine possède trois régions régulatrices contenant des promoteurs divergents. Une première région se situe entre le gène *fepB* et les gènes *entCEBA*, une deuxième région est entre le gène *fepDGC* et *entS* et finalement, la dernière région se situe entre *fepA* et *fes*. Toutes ces régions régulatrices sont sous le contrôle de Fur, puisque chacune d'elles possède une boîte Fur au niveau de leurs promoteurs (Brickman, Ozenberger et McIntosh, 1990; Christoffersen *et al.*, 2001; Lavrrar, Christoffersen et McIntosh, 2002). Ainsi, lorsque le niveau de fer intracellulaire est suffisamment élevé, le complexe Fe^{2+} -Fur se lie à la séquence consensus des promoteurs des gènes et empêche la transcription des gènes de synthèse et d'utilisation de l'entérobactine.

Par ailleurs, la région consensus Fur a été trouvée dans 101 promoteurs de gènes de *E. coli* K-12. La fonction de ces gènes régulés par Fur se regroupe en trois catégories, soit la réponse au stress ferrique, la production d'énergie et des gènes de fonction inconnue. 53 gènes réprimés et 48 gènes induits par le complexe Fe^{2+} -Fur ont été dénombrés, et ce, toute catégorie confondue. Effectivement, Fur ne joue pas seulement le rôle de répresseur, mais peut être aussi un activateur pour certains gènes en présence de fer ferreux (McHugh *et al.*, 2003).

1.11 L'entérobactine : facteur de virulence

Chez les humains et les animaux, le fer est complexé à diverses protéines, le rendant ainsi très peu disponible pour les bactéries. L'habileté des bactéries à obtenir le fer nécessaire à leur croissance et leur prolifération dans un organisme est considérée comme un déterminant de virulence important (Kochan, Kvach et Wiles, 1977). Il a été rapporté à plusieurs reprises que le sidérophore entérobactine jouerait un rôle important pour

l'obtention du fer lors d'une infection par les bactéries pathogènes (Furman *et al.*, 1994; Kochan, Kvach et Wiles, 1977; Rogers, 1973; Yancey, Breeding et Lankford, 1979). Des infections de souris par des souches de *Escherichia coli* et de *Salmonella typhimurium* avirulentes et/ou mutées dans les gènes de production de l'entérobactine ont démontré que l'injection de fer et/ou d'entérobactine dans les animaux provoquait une augmentation significative du taux de mortalité à un niveau comparable aux taux des souches virulentes (Kochan, Kvach et Wiles, 1977; Rogers, 1973; Yancey, Breeding et Lankford, 1979). De plus, la croissance des bactéries *E. coli* virulentes et avirulentes dans le sérum bovin et humain, dans le lait et dans les blancs d'œufs est arrêtée à cause du manque de fer dans ces milieux, mais cette inhibition est levée lors de l'ajout de fer et/ou d'entérobactine exogène. Cependant, l'inhibition de croissance est plus flagrante pour la souche avirulente que pour la souche virulente (Kochan, Kvach et Wiles, 1977). Ces expériences ont ainsi conféré le titre de facteur de virulence à l'entérobactine. Or, Benjamin et ses collaborateurs ont publié des résultats contraires à ceux obtenus précédemment. Ils ont trouvé que, bien qu'elle soit nécessaire pour la croissance dans le sérum murin, l'entérobactine n'est pas important pour la virulence des souches de *Salmonella typhimurium* qui causent la typhoïde chez les souris (Benjamin *et al.*, 1985). Cette dernière publication a ainsi jeté un doute sur l'importance de l'entérobactine pour la virulence de *S. typhimurium* dans le modèle de typhoïde murin.

Plus récemment, il a été démontré qu'une mutation dans le synthèse ou dans le transport de l'entérobactine atténuait la virulence de *Salmonella typhi* chez les souris et empêchait la survie de la bactérie dans les monocytes humains de la lignée cellulaire Mono Mac 6 (Furman *et al.*, 1994; Gorbacheva *et al.*, 2001). De plus, la croissance de cette bactérie dans le sérum humain, en présence de transferrines non-saturées, et dans les cellules HeLa est inhibée par ces mutations, mais elle est reprise en présence de transferrines complètement saturées. En somme, ces résultats suggèrent fortement que le système de l'entérobactine participe à la pathogenèse de la fièvre typhoïde (Furman *et al.*, 1994; Gorbacheva *et al.*, 2001). Par ailleurs, une étude récente a rapporté que l'incorporation du 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS) et non pas l'incorporation de l'entérobactine, est important pour l'établissement d'une infection par *Salmonella enterica* chez le modèle murin (Rabsch *et al.*, 2003). Il est à noter que le DHBS est aussi un sidérophore et il

provient de la dégradation de l'entérobactine (Hantke, 1990). En plus, Torres et ses collaborateurs ont démontré que la souche *E. coli* CFT073 mutante dans la production de l'entérobactine est toujours capable d'infecter la vessie et les reins dans le modèle murin d'infection ascendant du tractus urinaire (Torres *et al.*, 2001). Ainsi, encore une fois, l'interrelation entre l'entérobactine et la pathogénicité des bactéries n'est pas bien définie et reste à éclaircir.

Néanmoins, plusieurs autres recherches ont mené à l'élucidation de diverses fonctions de l'entérobactine. Tout d'abord, des expériences *in vitro* ont permis d'identifier la transferrine du sérum comme étant la source de fer utilisée par l'entérobactine (Brock *et al.*, 1991). De plus, une étude de Burton et ses collaborateurs a démontré que la croissance de *E. coli* dans un milieu minimum avec 30 % de sérum (SAPI+sérum) est stimulée lors de l'ajout du neurotransmetteur norépinéphrine (NE). En fait, la présence de norépinéphrine stimule la production et la sécrétion de l'entérobactine, aide à la séquestration du fer à partir de la transferrine et de la lactoferrine et fournit ainsi les quantités nécessaires en fer pour la croissance des bactéries (Burton *et al.*, 2002; Freestone *et al.*, 2003). En revanche, cette stimulation de croissance en réponse au NE est abolie s'il y a une mutation dans le transport ou la synthèse de l'entérobactine. Cette découverte prend de l'importance dans un contexte physiologique, puisque la relâche de la norépinéphrine dans la circulation systémique par les neurones se fait suite à un dommage tissulaire sévère. Les tissus endommagés peuvent être une porte d'entrée dans l'organisme pour les bactéries pathogènes. Il a été notamment observé que chez les patients se rétablissant d'une opération chirurgicale, les niveaux de norépinéphrine et de catéchols sont significativement plus élevés pour ceux qui développent des septicémies que ceux qui ne succombent pas à une infection (Burton *et al.*, 2002). Il a été proposé que la hausse de norépinéphrine chez l'hôte pendant un stress physiologique stimulerait les bactéries pathogènes présentes à initier leurs divers processus de pathogénie (Freestone *et al.*, 2003). En somme, la stimulation de croissance bactérienne par la norépinéphrine en présence de sérum est reliée à l'exploitation du système de l'entérobactine. Ceci confère donc une certaine importance à ce sidérophore, dont la participation à la pathogénie des souches virulentes est parfois nébuleuse.

1.12 Les colicines B et Ia

Les colicines sont des toxines produites par certaines souches de *Escherichia coli* qui ont pour cibles d'autres souches de *E. coli*, certaines Salmonelles et Shigelles (Brickman et Armstrong, 1996). La fonction première des colicines est donc de tuer les bactéries sensibles qui se retrouvent à proximité de la souche productrice (Hilsenbeck *et al.*, 2004). Il existe plusieurs types de colicines et elles ont été classées en deux groupes, soit le groupe A et le groupe B (Pugsley et Reeves, 1976a). Les gènes codant pour les colicines font partie du régulon *SOS* de *E. coli* et sont négativement régulés par le répresseur LexA (Brickman et Armstrong, 1996). Les colicines du groupe A sont reconnues pour être dépendantes du système Tol et les colicines du groupe B requièrent la protéine TonB, afin d'exercer leurs fonctions (Cao et Klebba, 2002). Le mécanisme d'action des colicines se résume en trois étapes : premièrement, il y a reconnaissance et liaison de la colicine au récepteur de la membrane externe, ensuite, il y a translocalisation périplasmique de la colicine qui nécessite l'énergie provenant de la force protomotrice de la membrane cytoplasmique et finalement il y a action du domaine toxique de la colicine au niveau de la cible cellulaire (Hilsenbeck *et al.*, 2004). Ces mécanismes d'action sont intimement reliés à chacune des fonctions des trois domaines protéiques des colicines. En effet, toutes les colicines possèdent un domaine de liaison, un domaine de translocation et un domaine toxique. Plusieurs mécanismes toxiques peuvent être entrepris par les différentes colicines, par exemple, certaines colicines vont dépolariser le gradient ionique de la membrane interne, d'autres vont dégrader les acides nucléiques et même dans certains cas, elles peuvent inhiber la synthèse des protéines et dégrader la paroi cellulaire de la bactérie (Cao et Klebba, 2002). La colicine B est une toxine de 55 kDa qui est reconnu par le récepteur du complexe ferri-entérobactine FepA. Vu le poids de la molécule, cette toxine nécessite un système de transport adéquat et ne peut pénétrer la membrane externe bactérienne par diffusion passive. Ainsi, la colicine B emprunte le système de transport de l'entérobactine au détriment de la cellule bactérienne. De plus, la toxicité de cette colicine repose sur sa capacité à déstabiliser le potentiel électrochimique de la membrane interne de la cellule en créant un pore dans cette dernière, menant en définitive à la mort de la bactérie (Hilsenbeck

et al., 2004). Par ailleurs, la colicine Ia est reconnue par le récepteur CirA de la membrane externe (Brickman et Armstrong, 1996). Cette colicine agit de façon identique à la colicine B (Zakharov et Cramer, 2002). Finalement, une mutation dans les gènes *tonB*, *exbB* et *exbD* abolit la sensibilité des bactéries aux colicine B et Ia (Pugsley et Reeves, 1976b). Effectivement, en abolissant le système de translocation énergétique TonB-ExbB-ExbD, il y a arrêt de l'incorporation de plusieurs macromolécules.

1.13 Les salmochelines

Les salmochelines sont des nouveaux sidérophores de type catécholate apparentés étroitement à l'entérobactine (figure 1.10). Ces sidérophores sont codés par les gènes *iroBCDEN* aussi nommés locus *iroA* (figure 1.11) (Bister *et al.*, 2004).

Il existe en fait sept composés membres de la famille des salmochelines SX, S0, S1, S2, S3, S4 et S5. Le composé S4 est en fait le sidérophore et les autres composés sont des dérivés de ce sidérophore. La structure de S4 est en fait un analogue de l'entérobactine deux fois glycosylée en C5. La structure de S0 est inconnue, mais se convertit rapidement en S4 dans un solvant sans sel. S2 s'est révélé être un analogue linéaire de S4 correspondant à l'hydrolyse du lien ester de la région non glycosylée de la molécule (Bister *et al.*, 2004). Cependant, la souche *Salmonella enterica* serotype Stanleyville inoculé dans un milieu pauvre en fer peut se servir de S2 à titre de sidérophore (Hantke *et al.*, 2003). De plus, des tests de croissances de la même bactérie en présence d'albumine démontrent que S2 et S4 sont de meilleures sources de fer que l'entérobactine. Quant à S3, puisqu'il possède la même masse moléculaire que S2, il s'est avéré être un isomère de S2. Selon Bister et ses collaborateurs, la structure de S1 correspondrait à un dimère de DHB (glucosyl)-seryl-DHB-sérine, SX serait un monomère de DHB (glycosyl)-sérine et S5 serait un dimère de SX (Bister *et al.*, 2004). La structure de SX est aussi identique à l'acide pacifarique identifié en 1975 par Wawszkiewicz et ses collaborateurs et est aussi nommé facteur de résistance à *Salmonella* (SRF) (Wawszkiewicz et Schneider, 1975).

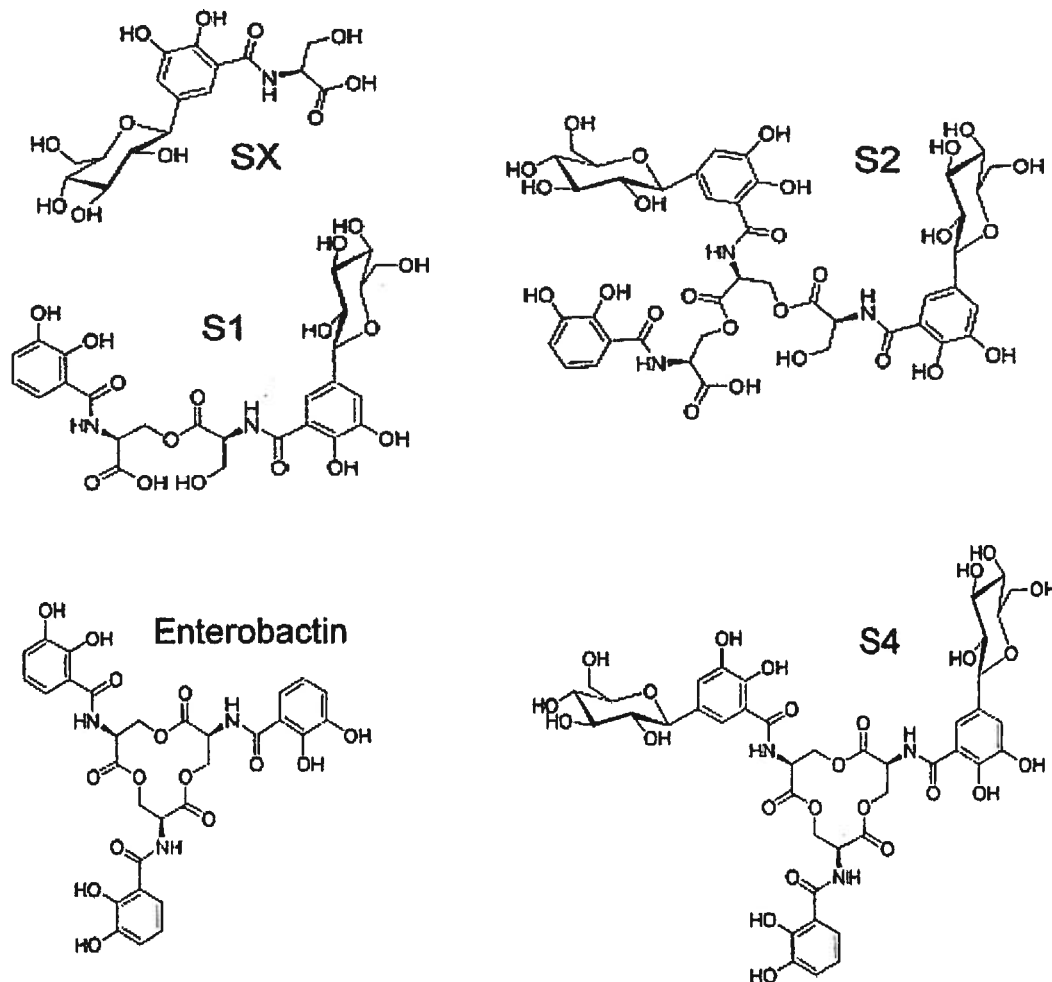


Figure 1.10 : Structures de l'entérobactine et des salmochelines SX, S1, S2 et S4 (Bister *et al.*, 2004).

1.13.1 Les gènes *iroBCDEN*

Le locus *iroA* a été tout d'abord trouvé chez *Salmonella typhimurium* suite à une étude sur l'effet d'une mutation dans le gène *fur* sur la synthèse des protéines régulées par le fer et le pH (Foster et Hall, 1992; Foster *et al.*, 1994). Par la suite, Bäumler et ses collaborateurs ont identifié plus précisément les gènes *iroBC* chez *Salmonella typhi* et chez *Salmonella typhimurium* suite à une expérience de titration par Fur (FURTA). Ils ont eux aussi trouvé que ces gènes étaient régulés par le fer. Cependant, ce n'est qu'en 1998 que les gènes *iroBCDEN* ont été complètement découverts par le même groupe de recherche (figure 1.11) (Baumler *et al.*, 1998). L'organisation génétique du locus *iroA* consiste en deux régions convergentes, soit un opéron *iroBCDE* avec un promoteur en amont de *iroB* et le gène *iroN*

possédant son propre promoteur. Une analyse des promoteurs des gènes *iroB* et *iroN* a révélé un site de liaison putatif pour le complexe Fe²⁺-Fur, suggérant ainsi une régulation par Fur (Baumler *et al.*, 1998; Baumler *et al.*, 1996).

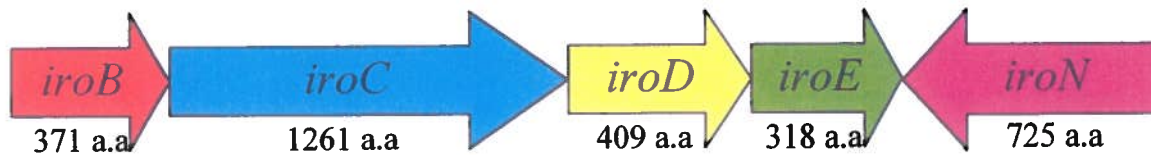


Figure 1.11 : Organisation génétique du système Iro.

1.13.1.1 Le gène *iroB*

Le gène *iroB* code pour une glycosyl transférase qui a pour fonction d'ajouter un glucose en C5 sur les molécules d'acide 2,3-dihydroxybenzoïque, produisant ainsi la salmocheline S4. IroB est donc la seule enzyme nécessaire pour convertir l'entérobactine en salmocheline. Ainsi, une mutation au niveau de ce gène inhibe la synthèse de la salmocheline (Bister *et al.*, 2004). Bien qu'il existe une relation structurelle entre les deux sidérophores, la voie de conversion de l'entérobactine en salmocheline reste encore à découvrir à ce jour. De plus, la séquence protéique de IroB présente des homologies avec les protéines MceC de *Klebsiella pneumoniae*, McMl et MchA de *E.coli*, qui sont probablement impliquées dans la maturation des microcines E492, M, H et H47 (tableau 1.1) (Azpiroz et Lavina, 2004; Patzer *et al.*, 2003).

1.13.1.2 Le gène *iroC*

Par ailleurs, le gène *iroC* possède une forte homologie avec les transporteurs de type ABC (tableau 1.1). En fait, IroC est présumé être la pompe exportatrice des salmochelines, puisque ces dernières sont de trop grande taille pour diffuser passivement à travers les membranes bactériennes. De plus, il a été rapporté que la présence des gènes *iroBN* seulement empêche la détection de la salmocheline S4 et de l'entérobactine. Ceci s'expliquerait par un arrêt de l'exportation de S4 par IroC causant une accumulation

intracellulaire de cette salmocheline et qui inhiberait par conséquent la sécrétion de l'entérobactine (Bister *et al.*, 2004).

1.13.1.3 Les gènes *iroD* et *iroE*

Les gènes *iroD* et *iroE* codent pour des estérases putatives. En effet, IroD exhibe une homologie de 28 % / 44 % (identité / similarité) à l'estérase de l'entérobactine Fes. La séquence protéique de IroE correspond à une hydrolase périplasmique putative (tableau 1.1). Ces deux gènes possèdent donc une fonction similaire présumée, soit la dégradation des liens esters présents chez des sidérophores, tels que l'entérobactine et les salmochelines. De plus, il a été noté que la mutation des gènes *iroD* et *iroE* augmentent significativement le niveau de la salmocheline S4 en comparaison avec le niveau détecté en présence des deux gènes. En fait, il y a augmentation des niveaux de S1 et de S2 en présence de IroD et de IroE et une baisse de leurs quantités en absence des deux estérases putatives (Bister *et al.*, 2004; Hantke *et al.*, 2003). Par ailleurs, la séquence protéique de IroD présente des homologies avec des gènes impliqués dans la synthèse de microcines et de colicines. En fait, IroD est homologue à MceD de *K. pneumoniae*, à McmK et MchS1 de *E. coli* (tableau 1.1). La protéine MceD de *K. pneumoniae* semble être impliquée dans la synthèse de la microcine E492, tandis que la protéine McmK de *E. coli* est une estérase putative de l'entérobactine et fait partie de l'opéron codant pour les colicines G et H. Les fonctions exactes de ces protéines ne sont toutefois pas connues, mais elles seraient probablement impliquées dans la maturation de leurs bactériocines respectives (Patzner *et al.*, 2003). Finalement, la protéine MchS1 fait partie de l'opéron contenant les gènes responsables de la biosynthèse de la microcine H47, mais la fonction exacte de cette protéine est également inconnue (Azpiroz et Lavina, 2004).

1.13.1.4 Le gène *iroN*

Finalement, le gène *iroN* a suscité beaucoup d'intérêt lors de sa découverte, puisque sa séquence nucléotidique code pour un récepteur de sidérophore. En fait, la séquence de *iroN* de *Salmonella typhimurium* et de *Salmonella typhi* identifiait ce gène comme un membre de la famille des récepteurs de la membrane externe dépendant de TonB et

présentait une forte homologie avec des récepteurs de l'entérobactine présents chez plusieurs différentes souches bactériennes (tableau 1.1). Des expériences ont en effet prouvé que IroN pouvait compléter l'incorporation de l'entérobactine, le DHBS et la myxocheline A dans une souche de *E. coli* mutante pour les gènes *fepA*, *cirA*, *fiu* et *aroB*. Ceci démontra que IroN était bel et bien un récepteur de la membrane externe pouvant incorporer des sidérophores de types catécholates (Baumler *et al.*, 1998). Cependant, bien que IroN ait une forte homologie à FepA, il est différent toutefois pour sa spécificité dans l'incorporation de certains substrats. En effet, plusieurs expériences ont révélé que IroN incorpore efficacement le sidérophore corynebactine, les microcines M, H47 et E492 et la salmocheline S2 et S4, mais ne reconnaît pas la myxocheline C, tandis que le récepteur FepA reconnaît la myxocheline C et les microcines M, H47 et E492, mais n'incorpore pas la corynebactine et la salmocheline S2 (Bister *et al.*, 2004; Hantke *et al.*, 2003; Patzer *et al.*, 2003; Rabsch *et al.*, 1999). En bref, IroN code donc pour le récepteur de la salmocheline (Hantke *et al.*, 2003).

De plus, le récepteur IroN a été trouvé chez plusieurs souches de *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC), notamment chez une souche uropathogène (UPEC), une souche pathogène aviaire (APEC) et chez une autre causant la méningite néonatale (ECNM) (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003; Negre *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 1999). Cependant, il est absent chez les souches de *E. coli* entéroaggrégative (EAEC) (Okeke *et al.*, 2004). Aussi, IroN₇₁₂₂ est fortement homologue à IroN_{Salmonella} (82 %) et à IroN_{CFT073} (99 %) (tableau 1.1).

Ainsi, les gènes *iroCDEN* codent pour un système d'utilisation du sidérophore salmocheline et seul *iroB* est impliqué dans la synthèse de la salmocheline.

Tableau 1.1 : Homologies des protéines Iro de la souche *E. coli* χ 7122.

Protéines Iro χ 7122	Homologues	Fonction putative des protéines	Identité / similarité (%)	#Accession
IroB		Glycosyl transférase		AAN76090
	IroB <i>E. coli</i> CFT073	glycosyl transférase	99 / 100	NP_753168
	IroB <i>S. enterica</i>	glycosyl transférase	86 / 92	NP_806379
	MceC <i>K. pneumoniae</i>	maturation de la microcine E492	75 / 86	AAL08396
	McmL <i>E. coli</i>	maturation des microcines M et H	71 / 84	CAD56178
	MchA <i>E. coli</i>	maturation de la microcine H47	71 / 84	CAG25570
IroC		Transporteur ABC		AAN76094
	IroC <i>E. coli</i> CFT073	transporteur ABC	99 / 99	NP_753167
	IroC <i>S. enterica</i>	transporteur ABC	80 / 89	NP_806380
	Mdr1 <i>Homo sapiens</i>	transporteur ABC, protéine de résistance multiple aux drogues	27 / 46	AAA59575
IroD		Estérase		AAN76091
	IroD <i>E. coli</i> CFT073	estérase de l'entérobactine	99 / 99	NP_753166
	IroD <i>S. enterica</i>	estérase de l'entérobactine	66 / 78	AAC46181
	MceD <i>K. pneumoniae</i>	maturation de la microcine E492	57 / 71	AAL08397
	McmK <i>E. coli</i>	maturation des microcines M et H	58 / 71	CAD56179
	MchS1 <i>E. coli</i>	maturation de la microcine H47	57 / 70	CAG25571
Fes <i>E. coli</i>	estérase de l'entérobactine	28 / 44	NP_415117	
IroE		Hydrolase périplasmique		AAN76092
	IroE <i>E. coli</i> CFT073	hydrolase périplasmique	98 / 99	NP_753165
IroE <i>S. enterica</i>	hydrolase périplasmique	61 / 73	AAC46182	
IroN		Récepteur de sidérophore catécholate		AAN76093
	IroN <i>E. coli</i> CFT073	récepteur de sidérophore catécholate	99 / 99	NP_753164
	IroN <i>S. enterica</i>	récepteur de sidérophore catécholate	82 / 92	AAC46183
	PirA <i>P. aeruginosa</i>	récepteur de sidérophore catécholate	59 / 76	AAC06224
	PfeA <i>P. aeruginosa</i>	récepteur de l'entérobactine	52 / 68	AAA25928
	FepA <i>E. coli</i> K-12	récepteur de l'entérobactine	50 / 67	NP_415116
	BfeA <i>B. parapertusis</i>	récepteur de l'entérobactine	34 / 76	NP_884726
	CirA <i>E. coli</i> K-12	récepteur de DHBS	32 / 47	NP_416660

1.14 Les salmochelines : facteurs de virulence

Le système Iro, qui code pour le sidérophore salmocheline, a été rapidement associé à un facteur de virulence, et ce, même avant que l'on ne découvre la véritable fonction du système. Tout débuta lorsque Bäumlér et ses collaborateurs criblèrent par PCR 150 souches bactériennes, représentant 51 sérotypes de différentes espèces et sous-espèces de *Salmonella* et quelques autres bactéries, à la recherche du gène *iroB*. Leurs recherches ont mené à la conclusion que *iroB* est présent chez *Salmonella enterica* sous-espèces *enterica*, *salamae*, *diarizonae*, *houtenae*, *arizonae* et *indica*, mais absent chez *Salmonella bongori*, *Escherichia coli* O157: H7, *Klebsiella pneumoniae* et quelques autres. Ainsi, ils ont conclu qu'il était maintenant possible de détecter rapidement les sérotypes de *Salmonella enterica* (Baumlér, Heffron et Reissbrodt, 1997).

Par la suite, le système *iroBCDEN* a été trouvé sur un îlot de pathogénicité génomique chez la souche *Escherichia coli* uropathogène (UPEC) CP9. Russo et ses collaborateurs ont tout d'abord démontré que l'expression de *iroN* de *E. coli* augmentait de 27,2 fois en présence d'urine humaine, de 65,8 fois dans le sang humain et de 207,2 fois dans le fluide péritonéal humain par rapport à l'expression de ce gène dans le milieu LB. De plus, son expression est réprimée en présence d'une source exogène de fer. En plus, le gène *iroN* est significativement plus prévalent dans les isolats de *E. coli* provenant du tractus urinaire et du sang que des isolats provenant des fèces humaines (Bauer *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 1999). Les chercheurs ont conclu qu'*iroN* présentait des caractéristiques de facteur de virulence potentiel (Russo *et al.*, 1999).

Par la suite, une banque de 67 souches de *E. coli* provenant de patients souffrant d'urosepsie a été criblée et 39 % de ces souches portaient le gène *iroN*. Néanmoins, *iroN* a été trouvé plus souvent chez les souches provenant de patients immunosupprimés. En outre, le groupe de recherche a trouvé sporadique la distribution phylogénique de *iroN* à travers le groupe B2 de la collection ECOR et très peu dans les groupes A, B1 et D, suggérant, sur une base évolutive, de multiples transferts horizontaux ou une délétion du gène (Johnson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2000). Par ailleurs, l'étude fait mention que la

détection de *iroN* est fortement associée avec la détection des gènes *iutA* (récepteur de l'aérobactine) et *cvaC* (colicine V), qui sont souvent codés sur des plasmides de type pColV (Johnson *et al.*, 2000). L'association de *iroN* avec ces plasmides suggère que le gène a pu être mobilisé via le transfert de plasmide. Toutefois, le gène *iroN* de la souche CP9 est flanqué de séquences *IS1230*, ce qui laisse croire que la mobilité de *iroN* pourrait être indépendante et ainsi ceci expliquerait les échanges entre les régions génomiques et plasmidiques (Johnson *et al.*, 2000; Russo *et al.*, 1999). Il n'en reste pas moins que l'acquisition du système *iro* et du gène *iroN* pour plusieurs souches bactériennes s'est fait par transfert horizontal avec plusieurs événements de transferts et de délétions, puisque les régions avoisinant les gènes *iroBCDEN* ne sont pas conservées à travers les différentes souches étudiées (Sorsa *et al.*, 2003).

Suite à la distribution phylogénique du gène *iroN*, la présence de ce dernier a été enfin trouvée importante pour la virulence de la souche uropathogène CP9. En effet, le groupe de recherche Russo / Johnson a démontré que la quantité de la souche CP9 mutante dans le gène *iroN* était significativement moins élevée dans la vessie, les reins et l'urine que la quantité de la souche parentale lors d'une infection en compétition dans le modèle d'infection ascendant du tractus urinaire chez la souris. Cette expérience consacra ainsi le titre de facteur de virulence à IroN (Russo *et al.*, 2002).

L'expression de IroN par *E. coli* dans les différents fluides corporels humains, sa prévalence chez les souches cliniques ExPEC et son rôle pour la virulence des souches uropathogènes fait du récepteur une excellente cible pour le développement d'un vaccin. Ainsi, des expériences d'immunisations sous-cutanées avec le récepteur dénaturé ont conféré une protection significative contre une infection au niveau des reins, mais se sont avérées inefficaces au niveau de la vessie, chez le modèle d'infection du tractus urinaire ascendant de la souris (Russo *et al.*, 2003).

De plus, une publication récente fait mention de l'importance du récepteur IroN pour l'infection de la souche *Escherichia coli* causant la méningite néonatale (ECNM). En fait, il existe dans la souche ECNM trois systèmes d'acquisition du fer, soit le sidérophore yersiniabactine, la salmocheline et le récepteur de l'hème ChuA. Cependant, seul le

récepteur de la salmocheline semble important pour permettre à la bactérie d'établir une infection chez le modèle de méningite néonatale du rat (Negre *et al.*, 2004).

Par ailleurs, le gène *iroC* a été identifié comme étant un gène spécifiquement pathogène, exprimé *in vivo* par la souche *Escherichia coli* pathogène aviaire χ 7122 (O78 : K80 : H9). En fait, le gène a été repêché par la technique de capture sélective de séquences transcrites (SCOTS) lors d'une infection par la souche *E. coli* χ 7122 chez des poulets âgés de trois semaines. L'identification du gène a mené à la découverte de la région *iroBCDEN* et à sa mutation sur le plasmide de virulence pAPEC-1 de la souche sauvage (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003; Dozois *et al.*, 2000). Il en résulta en une baisse significative de la persistance et de la capacité à établir une infection, surtout dans les poumons, par la souche mutante. De plus, la souche sauvage présente un phénotype avirulent lorsque les systèmes Iro, Aérobactine et Tsh sont inactivés. Toutefois, ce phénotype avirulent est complètement renversé, lorsque la souche triple mutante est complémentée par un plasmide codant pour le système *iro*. Ces expériences mettent en évidence le rôle significatif des gènes *iroBCDEN* dans l'établissement d'une infection par la souche χ 7122 pathogène aviaire (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003).

Chapitre II

Matériel et méthodes

2.1 Les souches utilisées

Plusieurs souches ont été utilisées pour l'élaboration de ce projet. Le tableau 2.1 résume les différentes souches d'*Escherichia coli* K-12 ou APEC utilisées et expose les génotypes, phénotypes, sources et références.

Tableau 2.1 : Souches de *E. coli* K-12 utilisées

Souches	Génotypes	Phénotypes	Source ou référence
χ289	W1485 λ-, F- <i>glnV44</i>		(Brown et Curtiss, 1996)
DH5α	F- (Φ80d <i>lacZ</i> ΔM15) Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1 recA1 hsdR17</i> (r _K -m _K ⁺) <i>deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i> λ-		BRL Life-Tech
H5058	<i>aroB tsx malT cirA fepA fiu</i>	Entérobactine- (synthèse et transport)	(Baumler <i>et al.</i> , 1998)
BW25113	<i>lacI^f rrnB_{T14} ΔlacZ_{WJ16} hsdR514 ΔaraBAD_{AH33} ΔrhaBAD_{LD78}</i>		(Datsenko et Wanner, 2000)
QT744	BW25113 Δ <i>fepA</i> :: <i>Km</i>	Récepteur d'entérobactine -	Hirota Mori NIST
QT746	BW25113 Δ <i>cirA</i> :: <i>Km</i>	Récepteur de DHBS-	Hirota Mori NIST
DM1187	<i>lexA51 lexA3</i>		(Brickman et Armstrong, 1996)
AN272	<i>proA2 lacY1 galK2 trp401 aroB351 argE3 rpsL xyl pheA tyrA4 kat mtl supE44 fesB thi</i> lysogen f	Entérobactine- (synthèse et dégradation)	(Langman <i>et al.</i> , 1972)
1017	F- <i>supE44 ara-14 galK2 lacY1 Δ (gpt-proA) 62 rpsL20 (Str^r) xyl-5 mtl-1 recA13 Δ (mcrC-mrr) hsdS20</i> (r _B -m _B -) <i>ent::Tn5</i>	Entérobactine – (synthèse) Km ^R	(Daskaleros, Stoebner et Payne, 1991)

Tableau 2.2 : Souches de *E. coli* pathogènes aviaires et dérivées utilisées

Souches	Génotypes	Phénotypes	Source ou référence
χ 7122	<i>Escherichia coli</i> pathogène aviaire (O78:K80:H9) <i>gyrA</i>	Nal ^R	(Provence et Curtiss, 1992)
χ 7301	$\Delta iucABCD iutA ::xylE$ <i>tsh ::tetAR(B)</i>	Aérobactine ⁻ et Tsh ⁻ Nal ^R Tc ^R	χ 7122
χ 7306	$\Delta iroBCDEN ::nptII$ <i>tsh ::tetAR(B) \Delta iucABCD</i> <i>iutA ::xylE</i>	Iro ⁻ Tsh ⁻ et Aérobactine ⁻ Nal ^R Tc ^R , Km ^R	χ 7301
QT163	$\Delta entD ::kan$	Entérobactine ⁻ (synthèse) Nal ^R Km ^R	χ 7122
QT179	$\Delta entD ::kan \Delta iucABCD$ <i>iutA ::xylE tsh ::tetAR(B)</i>	Entérobactine ⁻ ; Aérobactine ⁻ et Tsh ⁻ Nal ^R Tc ^R Km ^R	QT163

2.2 Les milieux de croissance et les milieux sélectifs

Les souches ont été régulièrement cultivées en milieu liquide LB (Luria-Bertani de Difco) et sur milieu solide TSA (tryptic soy agar de Difco). Ces milieux ont été supplémentés avec des antibiotiques nécessaires pour la sélection et le maintien des mutations et des vecteurs plasmidiques. Les antibiotiques utilisés sont le chloramphénicol, la kanamycine, la tétracycline et l'acide nalidixique à une concentration de 40 µg/ml. L'ampicilline a également été utilisée à une concentration de 200 µg/ml pour les souches pathogènes (χ 7122 et dérivées) et à 40 µg/ml pour les souches de *E. coli* K-12.

Le milieu NB (Nutrient Broth) (Difco) a été utilisé lors des courbes de croissance. À ce milieu, de l'acide shikimique (0,2 mM), de la thiamine (1 µg/ml) et des acides aminés tels que la proline (30 µg/ml), la leucine (20 µg/ml), l'histidine (22 µg/ml) et le tryptophane (20 µg/ml) ont été ajoutés. Ces suppléments compensent les différentes mutations dans les

gènes servant à la synthèse de l'entérobactine (acide shikimique) et des acides aminés. La 2,2-dipyridyl fut utilisée en tant que chélateur de fer à des concentrations de 50 μM pour la souche AN272 et ses dérivées et à 75 μM pour les souches H5058 et 1017 et leurs dérivées.

Le milieu Chrome azurol S (CAS) est un milieu qui a été utilisé pour la détection de sidérophores. Le colorant chromo azurol S forme un complexe avec le fer ferrique et le bromure d'hexadecyltriméthylammonium (HDTMA). En présence d'un chélateur fort, tel un sidérophore, le fer ferrique est arraché au complexe CAS- Fe^{3+} -HDTMA et le colorant passe de la couleur bleue à la couleur orange (Schwyn et Neilands, 1987). Ainsi, la présence de sidérophore peut être détectée. Pour un litre de milieu, il faut mettre 60,5 mg de CAS dans 50 ml d'eau et ajouter 10 ml d'une solution ferrique (1 mM de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 10 mM HCl). Ensuite, il faut y ajouter doucement un mélange de 72,9 mg de HDTMA dissout dans 40 ml d'eau. Ce milieu bleu foncé doit être stérilisé. Ensuite, il faut préparer une solution de 750 ml d'eau, 100 ml de milieu 10X MM9 sels, 15 g d'agar, 30,24 g de PIPES et 6,0 g de NaOH. Ce milieu doit être également stérilisé. Par la suite, les deux milieux sont mélangés doucement et il y a ajout de 30 ml d'acides casaminés déférés (solution à 10 %), de 20 ml de glucose 20 %, de 1 ml de MgSO_4 1 M et de 1 ml de CaCl_2 100 mM. De plus, à ce milieu, les antibiotiques requis, l'acide shikimique, la thiamine et les acides aminés ont été ajoutés aux concentrations mentionnées ci-haut.

Le milieu M63-glucose est un milieu minimal qui a servi à l'isolement et la détection de l'entérobactine et des salmochelines chez les souches pathogènes χ 7122 et ses dérivées. Ce milieu contient pour un litre, 13,6 g de KH_2PO_4 , 2 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 0,5 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Le pH est ajusté à 7,4 avec du KOH. En plus, le milieu est supplémenté par 2 ml de MgSO_4 1 M, 20 ml de glucose 20 %, 0,1 ml de CaCl_2 1 M et de la thiamine (1 $\mu\text{g/ml}$). La 2,2-dipyridyl a été ajoutée à une concentration finale de 75 μM . Les antibiotiques requis ont également été ajoutés

2.3 Les analyses bioinformatiques

Les analyses bioinformatiques des séquences protéiques ont été réalisées à l'aide de plusieurs logiciels informatiques. Premièrement, les séquences protéiques des gènes *iroBCDEN* et de leurs homologues ont été trouvés sur le site Internet de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Les alignements de séquences protéiques et des boîtes Fur putatives ont été effectués à l'aide du logiciel « BioEdit Sequence Alignment Editor » en utilisant la fonction « ClustalW Multiple alignment ». Les pourcentages d'identité et de similarité des séquences protéiques des homologues des gènes *iroBCDEN* ont été déterminés en soumettant les séquences au logiciel « blastp » sans filtre disponible au site Internet de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Le peptide signal de IroE fut identifié à l'aide du logiciel « SignalP V2.0.b2 » disponible au site <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-2.0/>. Finalement, les valeurs p des composantes analysées et détectées en CL / SM ont été calculées à l'aide du « Student's t-test » disponible au site http://www.physics.csbsju.edu/stats/t-test_bulk_form.html. Les valeurs p des infections chez les poulets ont été calculées en utilisant le test nonparamétrique Mann-Whitney du logiciel GraphPad Prism.

2.4 La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une technique qui permet de synthétiser de grandes quantités de fragments d'ADN. Cette technique fut développée par Kary Mullis en 1985. Le cycle d'amplification par PCR comporte trois étapes. Premièrement, l'ADN cible contenant la séquence à amplifier est dénaturé par la chaleur. Une température de 94°C et un temps d'attente de 1 minute sont nécessaires pour accomplir cette tâche. Ensuite, la température est abaissée entre 50 et 60 °C pendant 30 secondes, afin de permettre aux amorces nucléotidiques de s'hybrider aux séquences d'ADN identiques qui flanquent la région cible d'amplification. À cette température, des ponts d'hydrogène sont établis entre les amorces et l'ADN, c'est l'étape de l'hybridation. Finalement, la dernière étape consiste en la synthèse de nouveaux brins d'ADN par la polymérase d'ADN. Cette enzyme effectue l'élongation des amorces et ainsi synthétise des copies de la séquence

d'ADN cible. Cette réaction enzymatique s'effectue à une température de 68°C pour l'ADN polymérase Elongase de Invitrogen (Carlsbad, Californie, États-Unis) et produit un fragment d'ADN de 1000 nt par minute. Par la suite, ces trois étapes sont répétées 30 fois, produisant ainsi environ 1 milliard de copie de l'ADN cible (Prescott, Harley et Klein, 1995).

2.5 La mutagenèse

Les mutations au niveau des souches χ 7301 et χ 7306 ont été produites par Charles M. Dozois selon la méthode de l'échange allélique avec un vecteur suicide (tableau 2.1) (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003).

La mutation du gène *entD* dans la souche χ 7122 qui a généré la souche QT163 a été faite selon la méthode de Datsenko et Wanner (tableau 2.1) (Datsenko et Wanner, 2000). Cette méthode consiste en l'introduction dans le chromosome bactérien d'une cassette de résistance à un antibiotique portant à ses extrémités les séquences initiales et finales du gène à muter. Cet ADN a été préalablement synthétisé par PCR avec les amorces EntDKOs (5'-GTC TCG AAT ATG GTC GAT ATG AAA ACT ACG CAT ACC TCG TGT AGG CTG GAG CTG CTT C-3') et EntDKOas (5'- GCG AAT CGT ACC AGA TGT TGT CAA TTA ATC GTG TTG CAT ATG AAT ATC CTC CTT ATG TCC -3') qui ont amplifié le début et la fin du gène *entD* et la cassette kanamycine du plasmide pKD4. L'amplification s'est fait en utilisant l'ADN polymérase Elongase de Invitrogen à une température d'hybridation des amorces de 50°C.

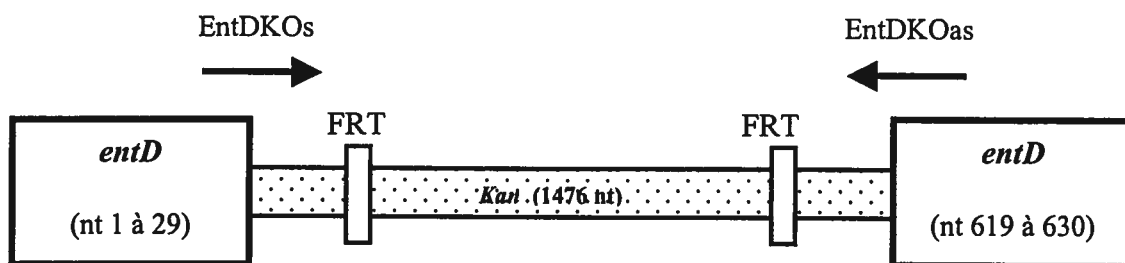


Figure 2.1 : Représentation schématique de l'amplification du produit de PCR servant à la mutation du gène *entD* par l'introduction de la cassette de résistance à la kanamycine de pKD4.

Le fragment de PCR fut purifié et extrait plusieurs fois en utilisant la trousse de purification et la trousse d'extraction Qiaquick de Qiagen (Mississauga, Ontario, Canada). Ensuite, le fragment a été digéré par *DpnI*, une enzyme de restriction qui coupe l'ADN méthylé. Cette étape sert à éliminer toute trace du plasmide pKD4 qui a servi de matrice d'amplification pour le gène de résistance à la kanamycine et qui est présent dans l'échantillon.

Par la suite, le fragment de PCR fut introduit par électroporation à 1,7 kV dans la souche χ 7122 électrocompétante portant le plasmide pKD46. Les cellules électrocompétentes ont été obtenues selon le protocole de Hanahan, Jessee et Bloom (Hanahan, Jessee et Bloom, 1995). Ce protocole consiste à faire croître la souche bactérienne χ 7122 (pKD46) dans un milieu riche supplémenté de 50 mM d'arabinose et ce jusqu'à l'obtention d'une densité optique de 0,75 à une longueur d'onde de 600 nm. Par la suite, les cellules ont été récoltées par centrifugation et le culot fut lavé trois fois avec une solution de 10 % de glycérol. Après le troisième lavage, le culot fut solubilisé dans 150 μ l de la solution de 10 % de glycérol et des aliquotes de 40 μ l ont été placées à -80°C jusqu'à leur utilisation.

Le plasmide thermosensible pKD46, présent dans la souche χ 7122, arbore les gènes γ , β et *exo*, constituant le système Red, et dont le promoteur est inductible à l'arabinose. Le gène γ code pour la protéine GAM qui a pour fonction d'inhiber l'exonucléase V RecBCD de l'hôte. Ainsi, les produits des gènes β et *exo* ont accès à l'ADN et peuvent produire la recombinaison (Datsenko et Wanner, 2000). Cette recombinaison est essentielle à l'intégration du fragment de PCR, afin de muter le gène *entD*.

Suite à l'électroporation du fragment de PCR, les bactéries transformées furent incubées à 30°C pendant 4 h dans du LB et 50 mM d'arabinose, afin de faciliter la recombinaison. Finalement, après l'incubation, les bactéries furent étalées sur une boîte TSA avec 30 μ g/ml de kanamycine et incubées à 37°C pour toute la nuit. Il y eut croissance d'une colonie résistante à l'antibiotique kanamycine. De plus, la perte de la résistance à l'ampicilline de la bactérie mutée a confirmé la perte du plasmide thermosensible pKD46, suite à l'incubation de cette colonie à 37°C. Finalement, la mutation a été vérifiée par PCR en utilisant des amorces qui amplifient la fin du gène *entD*, dans la région qui n'a pas été

mutée et le début de la cassette kanamycine, soit les amorces EntD endR (5'-AGA AGC TTT GTT GCG GCC ACA GAC -3') et EntDKOs. Une deuxième vérification par PCR a été effectuée en utilisant des amorces qui amplifient le début du gène *entD*, dans la région non-mutée, et la fin de la cassette kanamycine, soit les amorces EntDexS (5'-ACC TGG TAC CGC AAG CAG CA- 3') et EntDKOAS. Ces vérifications ont permis d'identifier clairement que l'insertion de la cassette kanamycine s'est produite dans le gène *entD* seulement.

Par la suite, une conjugaison sur milieu solide entre la souche χ 7301 et la souche QT163 a généré la souche QT179 (tableau 2.1). Cette conjugaison a permis de transférer le plasmide pAPEC-1 de la souche χ 7301 à la souche QT163, le plasmide pAPEC-1 étant muté au niveau des gènes *tsh* :: *tetAR(B)* et *iucABCDiutA* :: *xylE*. La conjugaison s'est produite en inoculant en strie croisée chaque souche sur une gélose sans antibiotique, de façon à obtenir une grande zone de contact entre les deux bactéries. Après incubation à 37°C pendant 18h, il y a récupération de cette zone de contact et sélection des bactéries résistantes à la kanamycine et à la tétracycline, et ce afin d'obtenir la souche χ 7122 *entD*, *tsh* et *iucABCDiutA* (QT179).

Le profil plasmidique des différentes souches sauvages mutées et complémentées a été vérifié par la technique développée par Kado et Liu (Kado et Liu, 1981). Cette technique sert à visualiser la présence de petits et gros plasmides de taille allant entre 2,6 à 350 MDa. Cette étape a été réalisée afin de s'assurer que tous les plasmides originaux ou modifiés sont présents dans les souches bactériennes mutées, et ce, avant de procéder à des expériences d'infections dans le modèle aviaire.

2.6 Les constructions plasmidiques

Plusieurs plasmides ont été produits au cours de ce projet (tableau 2.2). Le vecteur de clonage utilisé est pACYC184 qui est un vecteur de 4244 pb de faible copie par cellule et dont l'origine de répllication provient du plasmide p15A (Chang et Cohen, 1978). Le plasmide p15A provient de la souche *E. coli* 15 et il est un des plus petits plasmides cryptiques connus. Ce plasmide possède toutes les fonctions nécessaires pour subvenir à sa

une résistance à la tétracycline et au chloramphénicol. Cependant, tous les clonages ont été effectués dans le gène ou dans la région du promoteur du gène codant pour la résistance à la tétracycline et ainsi ils ont donc tous inactivé ce gène de résistance. Tous les plasmides sont donc résistants au chloramphénicol et sensibles à la tétracycline.

Par ailleurs, les clones ont été obtenus grâce aux différentes enzymes de restriction et à ligase T4 de chez New England Biolabs. Quant au clonage par PCR, la polymérase utilisée, l'Elongase, est un enzyme de haute fidélité fourni par Invitrogen. Les extractions, purifications et minipreps ont été effectuées à l'aide des différentes trousse de Qiagen. De plus, les plasmides ont été obtenus suite à leurs transformations par choc thermique dans des cellules chimiocompétentes de *Escherichia coli* DH5 α .

2.6.1 Les plasmides *iro*

Tout d'abord, les gènes *iroBCDEN* ont été préalablement clonés sur le vecteur pACYC184 au site *Hind* III par Charles M. Dozois générant le plasmide pYA3661 (pIJ20) de 15781 pb. Par la suite, des sous-clones ont été produits à partir de ce plasmide.

Le plasmide pIJ33, de 8207 pb, a été créé en clonant le gène *iroN* de pIJ20 dans le vecteur pACYC184 au site *Sph* I. Le plasmide pIJ34, de 13509 pb, a été produit suite au clonage des gènes *iroBCDE* de pIJ20 digéré aux sites *Hind* III et *Ssp* I dans le vecteur pACYC184 aux sites *Hind* III et *EcoR* V. Les plasmides pIJ37, de 12919 pb, et pIJ38, de 10647 pb, sont des sous-clones de pIJ20 et pIJ34 respectivement dans lesquels il y a eu digestion avec l'enzyme *Kpn* I qui coupa à trois endroits le gène *iroC*. Ces digestions ont permis d'enlever le gène *iroC* sans provoquer de changement dans le cadre de lecture. Il y a eu ligation des fragments linéaires créant ainsi les clones pIJ37 (*iroBDEN*) et pIJ38 (*iroBDE*).

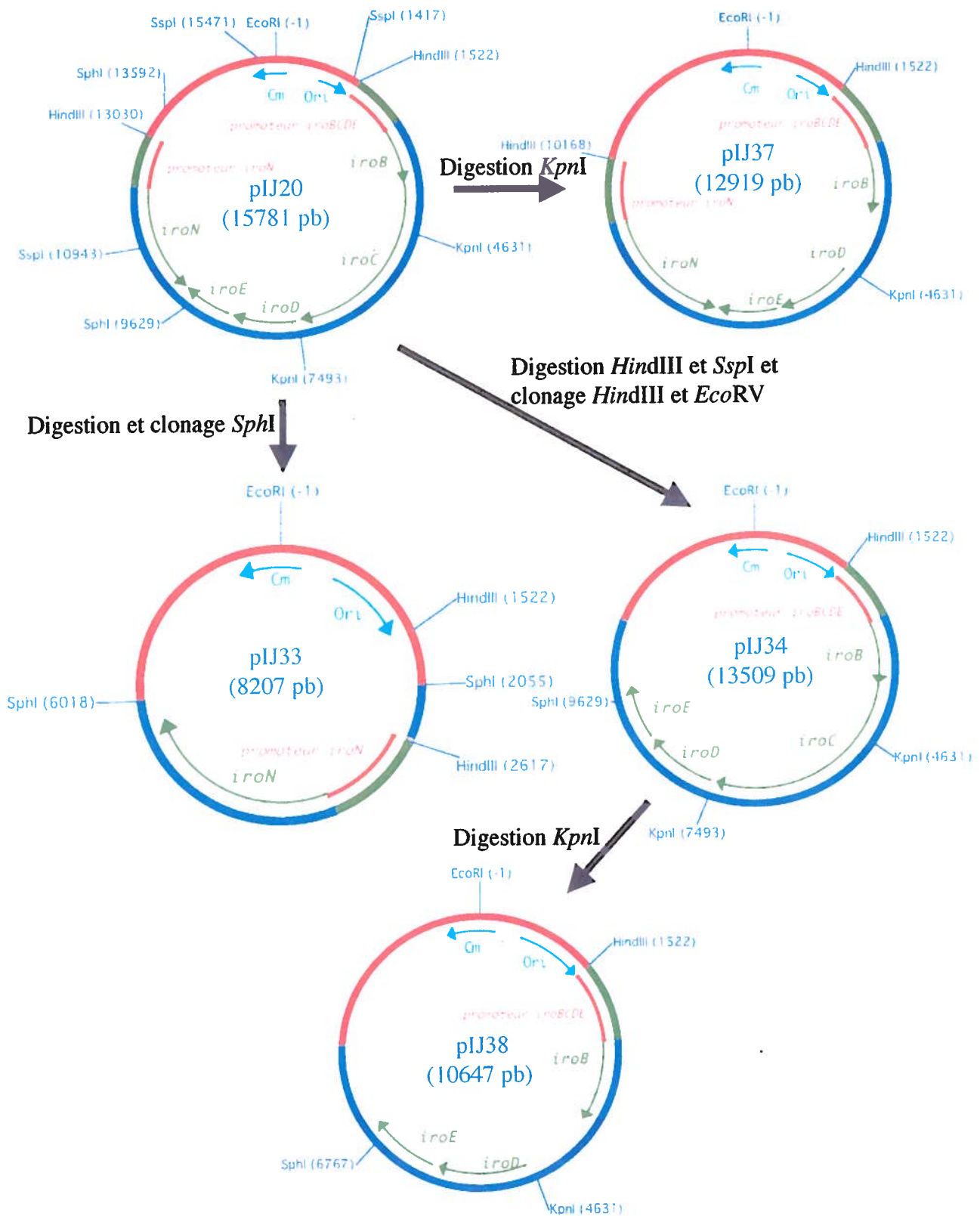


Figure 2.2: Schéma des constructions des plasmides pIJ20 (pACYC184 + *iroBCDEN*), pIJ33 (pACYC184 + *iroN*), pIJ34 (pACYC184 + *iroBCDE*), pIJ37 (pACYC184 + *iroBDEN*) et pIJ38 (pACYC184 + *iroBDE*)

Le plasmide pIJ48 possède les gènes *iroDE* avec leur promoteur natif qui est situé en amont du gène *iroB*. Ce plasmide de 8601 pb a été obtenu par PCR inverse avec des amorces qui amplifiaient tout le plasmide pIJ34 (pACYC184 + *iroBCDE*) sauf les gènes *iroBC*. Les amorces utilisés sont InvpromB AS (5'-CGC TCG AGA AAA TCC CTC TCC GCT TGA-3') et InvDE S (5'-ACC TCG AGA TAG TTA CTG GAC ACG TAA-3'). Ces amorces possèdent des sites de restrictions *Xho* I à leurs extrémités 5'. La température d'hybridation des amorces fut de 59°C. La digestion avec *Xho* I et la ligation du fragment linéaire a permis l'obtention du clone *iroDE* avec le promoteur natif.

Le plasmide pIJ52, de 7400 pb, est dérivé du plasmide pIJ48. En fait, le plasmide pIJ48 (pACYC184 + *iroDE*) a été digéré avec l'enzyme de restriction *Bgl* II qui digère le gène *iroE* à trois endroits sans couper au niveau du gène *iroD*. Une ligation du fragment contenant le gène *iroD* a simplement été effectuée après extraction et purification afin d'obtenir le plasmide pIJ52.

Le plasmide pIJ54, de 7270 pb, est dérivé du plasmide pIJ38 (pACYC184 + *iroBDE*). Cependant, pIJ54 possède seulement le gène *iroE*. Cette construction a été obtenue par PCR inverse suite à l'amplification du plasmide pIJ34 avec des amorces qui amplifient seulement le promoteur natif et le gène *iroE*. Les amorces utilisées sont InvpromB AS (5'-CGC TCG AGA AAA TCC CTC TCC GCT TGA-3') et InvE S (GTT TAC TCG AGG GTT GAG TTG ACC CAC) qui possèdent des sites de restrictions *Xho* I à leurs extrémités 5'. La température d'hybridation des amorces fut de 59°C. La digestion avec *Xho* I et la ligation après extraction et purification ont permis d'obtenir le plasmide pIJ54.

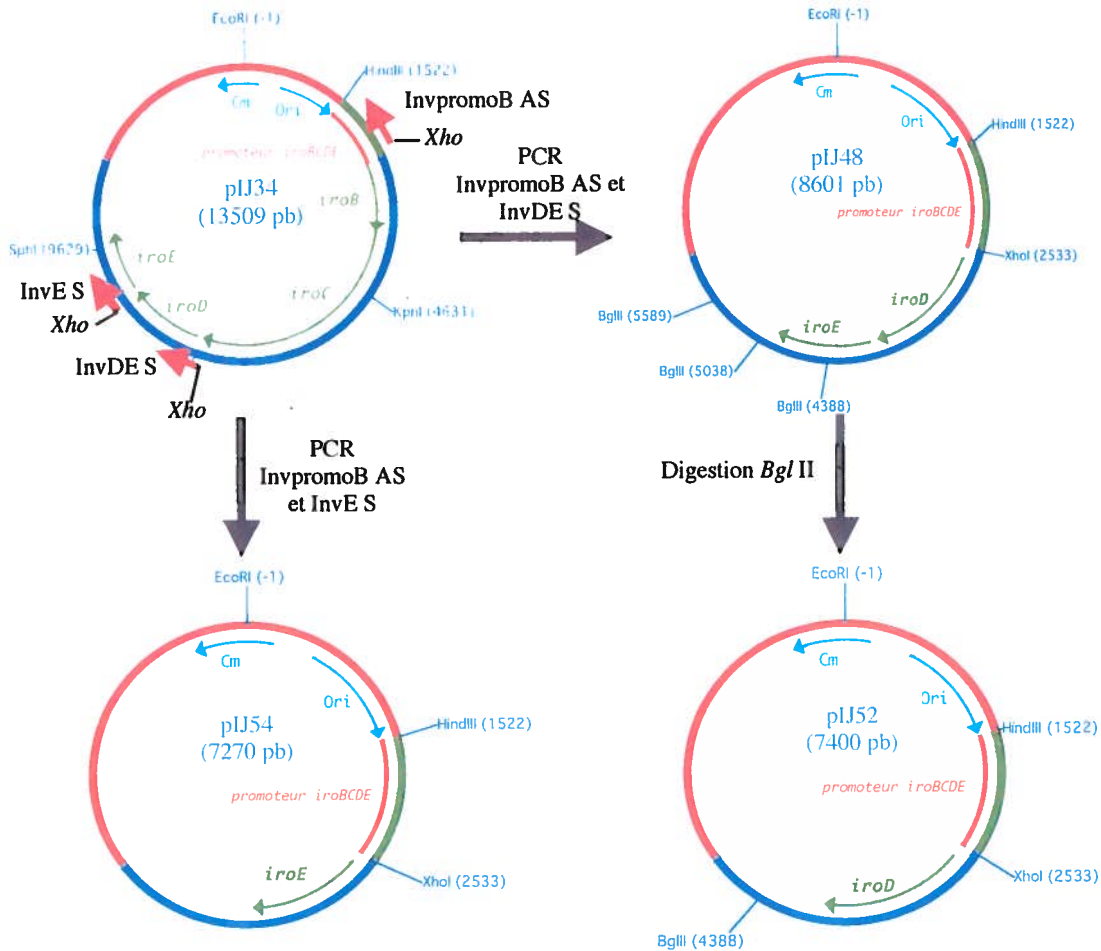


Figure 2.3 : Schéma des constructions des plasmides pIJ48 (pACYC184 + *iroDE*), pIJ52 (pACYC184 + *iroD*) et pIJ54 (pACYC184 + *iroE*).

2.6.2 Les plasmides de compléments

Le plasmide pIJ35, de 8879 pb, est un plasmide de complémentation. Il fut créé afin de compléter les mutations *fes*, *entD* et *fepA* chez les différentes souches utilisées dans ce projet. Les amorces EntD endR (5'-ACA AGC TTT ACA CTT TCG CCC GT-3') et Fes endR (5'-AGA AGC TTT GTT GCG GCC ACA GAC-3'), qui contiennent des sites *Hind* III à leurs extrémités 5', ont été utilisées pour amplifier les gènes *fes*, *entD* et *fepA* qui se retrouvent côte-à-côte sur le chromosome de *E. coli*. La température d'hybridation des amorces utilisées fut de 60°C et la matrice d'amplification fut l'ADN génomique de la souche *E. coli* K-12 ~~289~~. Le fragment de PCR obtenu a été cloné dans le vecteur pACYC184 au site *Hind* III.

Le plasmide pIJ68, de 7659 pb, arbore le gène *fepA* cloné au site *Hind* III dans le vecteur pACYC184. Le gène cloné est un produit de PCR obtenu à partir des amorces cloneFepA R (5'-GAA AAG CTT AAC CGC AGT CTG CGA GT-3') et cloneFepA F (5'-GCC AAG CTT CGC GCA ATT CGA GGC G-3') qui possèdent des sites *Hind* III à leurs extrémités 5'. La matrice de départ pour l'amplification fut l'ADN génomique de la souche χ 289. La température d'hybridation des amorces utilisée fut de 58°C.

Toutes les constructions plasmidiques ont été vérifiées par PCR et en effectuant des minipreps et des digestions avec différentes enzymes de restrictions.

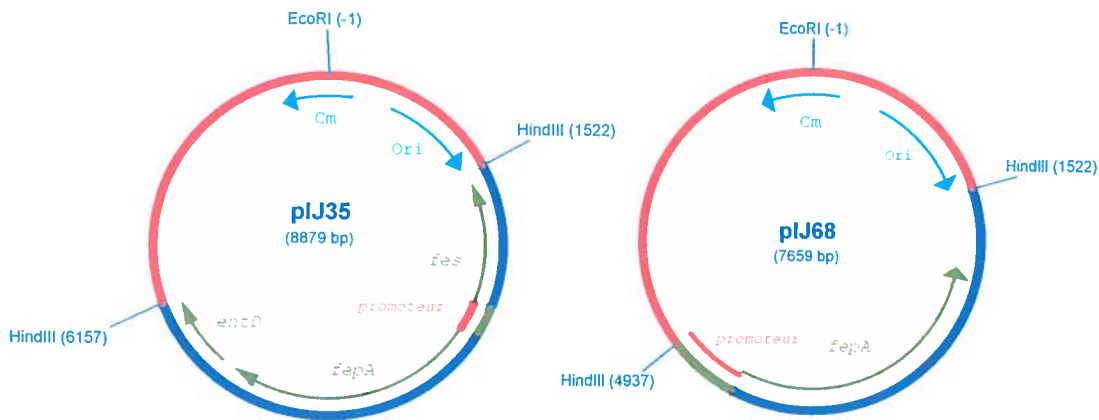


Figure 2.4 : Schéma des constructions des plasmides pIJ35 (pACYC184 + *fes fepA entD*) et pIJ68 (pACYC184 + *fepA*).

2.6.3 Les autres plasmides utilisés

Au cours de ce projet, plusieurs autres plasmides ont été utilisés, mais dont la construction a été effectuée par d'autres groupes de recherches (tableau 2.2). Tout d'abord, le plasmide pCD3 provient du groupe du Dr Keith Poole de Queens University à Kingston en Ontario. Ce plasmide code pour le récepteur de l'entérobactine, PfeA, chez la souche *Pseudomonas aeruginosa*. Ce plasmide arbore un fragment de 5,3 kb, dans lequel il y a le gène *pfeA*, cloné aux sites *Sst* I et *Sph* I dans le vecteur pAK1900. Ce plasmide est résistant à l'ampicilline (Dean et Poole, 1993).

Ensuite, le plasmide pABN1 provient du groupe du Dr J. B. Neilands. Ce plasmide code pour les gènes de synthèse de l'aérobactine *iucABCD* et le récepteur de l'aérobactine *iutA*. Ces gènes ont été clonés sur le vecteur pPlac au site *Hind* III. Le plasmide résultant est de 18,3 kb. Ce plasmide est résistant à l'ampicilline (Bindereif et Neilands, 1983).

Finalement, des plasmides codant pour les gènes de synthèse des colicines B et Ia ont été fournis par le groupe du Dr Sandra K. Armstrong. Le plasmide p3Z/ColB contient les gènes *cba* et *cbi* qui codent pour la production de la colicine B et pour l'immunité respectivement. Ces gènes ont été clonés dans le vecteur pGEM3Z aux sites *Pst* I et *EcoR* I et transformés dans la souche *E. coli* DM1187. Le plasmide p3Z/ColIa possède les gènes *cia* et *iia* qui codent pour la synthèse et l'immunité de la colicine Ia. Ces gènes ont été également clonés dans le vecteur pGEM3Z aux mêmes sites de restrictions et transformés dans la même souche. Ces plasmides sont résistants à l'ampicilline (Brickman et Armstrong, 1996).

Tableau 2.3 : Tableau récapitulatif des plasmides utilisés

Plasmides	Caractéristiques	Résistance
pACYC184	p15 réplicon	Tc ^R , Cm ^R
pIJ20	pACYC184 :: <i>iroBCDEN</i>	Cm ^R
pIJ33	pACYC184 :: <i>iroN</i>	Cm ^R
pIJ34	pACYC184 :: <i>iroBCDE</i>	Cm ^R
pIJ35	pACYC184 :: <i>fes, fepA, entD</i>	Cm ^R
pIJ37	pACYC184 :: <i>iroBDEN</i>	Cm ^R
pIJ38	pACYC184 :: <i>iroBDE</i>	Cm ^R
pIJ48	pACYC184 :: <i>iroDE</i>	Cm ^R
pIJ52	pACYC184 :: <i>iroD</i>	Cm ^R
pIJ54	pACYC184 :: <i>iroE</i>	Cm ^R
pIJ68	pACYC184 :: <i>fepA</i>	Cm ^R
pCD3	pAK1900 :: <i>pfeA</i>	Ap ^R
pABN1	pPlac :: <i>iucABCDiutA</i>	Ap ^R
p3Z/ColB	pGEM3Z :: <i>cba cbi</i>	Ap ^R
P3Z/ColIa	pGEM3Z :: <i>cia iia</i>	Ap ^R

2.7 Les souches transformées

Plusieurs souches ont été transformées avec les différents plasmides énumérés ci-dessus, et ce, afin de tester les diverses hypothèses de ce projet de recherche. La transformation par choc thermique a été utilisée pour l'incorporation des plasmides dans les souches de *E. coli* K-12, telles que H5058, 1017 et AN272. L'électroporation a été effectuée pour les souches sauvages telles que χ 7122 et χ 7306. Les protocoles utilisés sont tirés d'une revue écrite par Hanahan, Jessee et Bloom (Hanahan, Jessee et Bloom, 1995).

2.8 Les courbes de croissances

La croissance des souches H5058, 1017 et AN272 et de leurs dérivées a été mesurée toutes les heures pendant 9 h et à 24 h par le spectrophotomètre Thermo Spectronic Genesys 20. La densité optique a été prise à une longueur d'onde de 600 nm. Les souches ont été inoculées dans 20 ml de NB supplémenté d'acides aminés, d'acide shikimique, de thiamine et d'antibiotiques si nécessaire. De plus, la 2,2-dipyridyl a été ajoutée au milieu. L'inoculum de départ provient d'une préculture poussée dans du NB sans dipyrindyl et la quantité ajoutée à la culture procurait une densité optique de 0,020 unité d'absorbance (u.a.). Les souches ont été incubées à 37°C avec agitation. Les courbes de croissances ont été faites en triplicata.

2.9 Les extractions des colicines B et Ia et tests de sensibilités

L'extraction des colicines B et Ia a été effectuée selon le protocole établi par Brickman et Armstrong (Brickman et Armstrong, 1996). Les souches DM1187 p3Z/ColB et DM1187 p3Z/ColIa ont été cultivées dans 100 ml de LB avec 100 μ g/ml d'ampicilline pendant 18 h. Ensuite, une centrifugation a permis la récupération du culot bactérien. Ce culot a été lavé avec 25 ml de HEPES 50 mM à pH 7,4 et une deuxième centrifugation a permis de suspendre le culot dans 4 ml de HEPES afin d'obtenir une densité optique de 5,0 à 600 nm. Par la suite, les cellules ont été lysées à l'aide de la presse de French (French press). Finalement, les débris cellulaires ont été enlevés par ultracentrifugation à 100 000 g et par filtration sur un filtre de 0,2 μ m. La stérilité des colicines a été testée en inoculant sur une gélose TSA sans antibiotique 10 μ l de chaque extrait de colicine. Ces boîtes ont été

incubés à 37°C pour 18 h et aucune colonie n'a été décelée. Les colicines ont été entreposées à -70°C.

Les tests de sensibilités aux colicines B et Ia ont été effectués sur la souche H5058 et ses dérivées (H5058 complémentée avec les plasmides pACYC184, pIJ20, pIJ33, pIJ34, pIJ68 et pCD3). Un tapis bactérien a été inoculé à l'aide d'un écouvillon sur une gélose TSA avec les antibiotiques appropriés. 10 µl de chaque colicine a été inoculé sur le tapis bactérien et les boîtes ont été incubés à 37°C pour 18 h. Le diamètre de la zone d'inhibition de croissance a été ensuite mesuré.

2.10 Les extractions à l'acétate d'éthyle de l'entérobactine et de ses produits de dégradation

La souche AN272 et ses dérivées (AN272 complémentée avec les plasmides pACYC184, pIJ35, pIJ48, pIJ52 et pIJ54) ont été cultivées dans 50 ml de NB supplémenté d'acide shikimique, de thiamine, d'acides aminés, d'antibiotiques et de 2,2-dipyridyl (50 µM). La dipyridyl n'a pas été ajoutée dans le milieu de croissance des souches AN272 et AN272 (pACYC184), puisqu'elles sont incapables de croître sous ses conditions. Ensuite, les bactéries ont été placées à 37°C avec agitation pendant 18 h. Les cultures ont ensuite été centrifugées à 4000 rpm et les surnageants ont été récupérés et filtrés. Les surnageants ont été acidifiés avec de l'acide chlorhydrique jusqu'à l'obtention d'un pH de 1,5. Par la suite, environ 25 ml d'acétate d'éthyle a été ajouté à chaque surnageant. L'entérobactine et ses produits de dégradations ont la propriété de passer dans la phase acétate d'éthyle. Un mélange vigoureux a été ensuite effectué et la phase contenant l'acétate d'éthyle a été récupérée. Cette étape a été répétée trois fois. Les trois extractions à l'acétate d'éthyle de chaque surnageant ont été mises en commun et elles ont été déshydratées au sulfate de sodium (Na₂SO₄). Ces extractions ont ensuite été évaporées sous vide. Les composés résiduels ont été solubilisés dans 1 ml d'une solution de 30 % acétonitrile et 1 % d'acide acétique. Les échantillons ont finalement été filtrés sur un filtre de 0,2 µm et analysés au HPLC couplé au spectromètre de masse en mode positif. L'expérience a été effectuée en triplicata pour chaque culture bactérienne.

2.11 La purification des salmochelines et de l'entérobactine par colonne DE52 DEAE-cellulose

Les souches $\chi 7301$, $\chi 7306$, $\chi 7306$ (pIJ20), $\chi 7306$ (pIJ33), $\chi 7306$ (pIJ34), $\chi 7306$ (pIJ37), $\chi 7306$ (pIJ38), QT163 et QT179 ont été utilisées pour la production des salmochelines et de l'entérobactine. Pour ce faire, ces souches ont été cultivées dans le milieu M63-glucose avec 75 μM de dipyridyl et les antibiotiques appropriés. Les cultures ont été mises à 37°C avec agitation pendant 18 h. Après l'incubation, chaque culture a été centrifugée et le surnageant a été récupéré. À 100 ml de surnageant, 5 mM de FeCl_3 a été ajouté et le tout a été filtré sur un filtre de 0,2 μm . Le fer rajouté au surnageant réagit avec les sidérophores et produit une couleur violette. Le surnageant a été passé sur une colonne de DE52 DEAE-cellulose. Cette résine est une matrice anionique capable de capter les complexes ferri-sidérophores, qui se concentrent sur celle-ci et produisent des couleurs intenses allant du rouge au violet. La matrice a été humidifiée avec de l'eau milli-Q et compactée dans une colonne en verre de façon à obtenir une colonne de 1,9 cm de diamètre par 5 cm de hauteur. Le surnageant a été passé sur cette colonne avec l'aide d'une faible pression d'azote. Ensuite, la colonne a été lavée avec 100 ml d'eau milli-Q et éluée avec du NH_4Cl 2 M. Les fractions de couleurs ont été récupérées et les volumes ont été notés. Ensuite, 1 ml de chaque échantillon a été filtré sur un filtre de 0,2 μm et analysé au HPLC couplé au spectromètre de masse en mode positif. L'expérience a été effectuée en triplicata pour chaque souche analysée.

2.12 Les analyses en chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (CL/SM)

Les analyses par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse ont été produites à l'aide d'un HPLC de marque HP 1100 (Agilent Canada). La colonne de chromatographie utilisée est une C8 de marque Luna Phenomenex de dimensions 150 mm X 3 mm. Le spectromètre de masse est un QuattroII (Micromass Canada). Les analyses ont été effectuées par électronébulisation en mode positif et avec un balayage en mode complet. Un balayage entre 200 et 1200 m/z a permis la détection des ions pseudomoléculaires des salmochelines, de l'entérobactine et de leurs produits de dégradations. En mode positif, les monomères, dimères, trimères et l'entérobactine

cyclique sont détecté à m/z 242, 465, 688 et 670, respectivement. Les salmochelines SX, S1, S2, S4 et S5 sont détectées à m/z 404, 627, 1012, 994 et 789, respectivement.

2.13 Les infections chez le modèle aviaire

Sept groupes de poulets blancs de type Leghorn «specific-pathogen-free» âgés de trois semaines (ferme SPAFAS) ont été élevés dans des isolateurs séparés et ont été inoculés dans le sac aérien droit avec 0,1 ml (10^7 CFU) d'inoculum bactérien. Le nombre de poulets par groupe varie entre 5 et 10. Les souches utilisées sont χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20), χ 7306 (pIJ33), χ 7306 (pIJ34), QT163 et QT179. Les cultures bactériennes ont été cultivées dans le bouillon BHI (Brain Heart Infusion) pendant 24 h. Des prises de sang de chaque poulet ont été récoltées aseptiquement à 6, 24 et 48 h suivant l'inoculation et 0,1 ml et des dilutions 1/30, 1/300 et 1/3000 dans du PBS (phosphate-buffered saline) à pH 7,4 ont été étalés directement sur des géloses MacConkey-lactose (Difco) supplémentées d'acide nalidixique (40 μ g/ml) et avec les antibiotiques appropriés dans le cas des mutants et des souches complémentées. Les boîtes ont été placés à 37°C pendant 18 h.

Tous les poulets ont été euthanasiés à 48 h post-infection et une autopsie a été faite sur chacun. Des lésions fibreuses sur les sacs aériens, le cœur, le foie et les poumons ont été observées et évaluées. Le foie, la rate et le poumon gauche ont été prélevés aseptiquement et pesés. Deux volumes de PBS ont été ajoutés à chaque échantillon d'organe de façon à obtenir un ratio de 1 : 3. Ensuite ces échantillons ont été homogénéisés avec un homogénéisateur de type omnimixer. Des dilutions 1/30, 1/300 et 1/3000 ont été étalées sur des géloses MacConkey-lactose avec les antibiotiques appropriés et incubés à 37°C pendant 18 h. Le dénombrement bactérien s'est effectué en comptant chaque colonie de chaque gélose. Le nombre de UFC / ml ou UFC / g (unité formatrice de colonie) a été calculé pour chaque dilution d'un même échantillon et la moyenne a ensuite été déterminée.

Chapitre III

Résultats

3.1 La caractérisation du gène *iroN*

La caractérisation des gènes *iroBCDEN* a débuté par l'étude du gène *iroN*. Il a été démontré que ce gène code pour un récepteur de sidérophore, telles l'entérobactine et les salmochelines. Cependant, ces résultats sont le fruit d'expériences d'incorporation du fer radioactif couplé aux sidérophores et de croissance bactérienne en milieu solide en présence de sidérophores exogènes essentiels à la croissance des souches en milieu pauvre en fer (Baumler *et al.*, 1998; Hantke *et al.*, 2003). Aucune de ces expériences n'a établi clairement la courbe de croissance en milieu pauvre en fer de souches mutantes pour le récepteur de l'entérobactine et complémentées par *iroN*. Ainsi, suite à la construction des plasmides pIJ20 (*iroBCDEN*) et pIJ33 (*iroN*) et à leur introduction par choc thermique dans la souche H5058, la croissance de ces souches a été mesurée par spectrophotométrie toutes les heures. La souche H5058 a été choisie puisqu'elle produit un seul sidérophore soit l'entérobactine et qu'elle possède des mutations au niveau des gènes *fepA*, *cirA* et *fiu*, ce qui abolit toute production de récepteur de sidérophore. Ainsi, la souche H5058 ne peut aucunement incorporer l'entérobactine et le DHBS qui lui permettraient une bonne croissance en milieu pauvre en fer. De cette façon, les résultats observés sont directement attribuables à l'effet des gènes introduits dans la souche. Des contrôles, dont H5058 (pACYC184), H5058 (pIJ68) (*fepA*) et H5058 (pCD3)(*pfeA*) ont également été soumis à l'expérience.

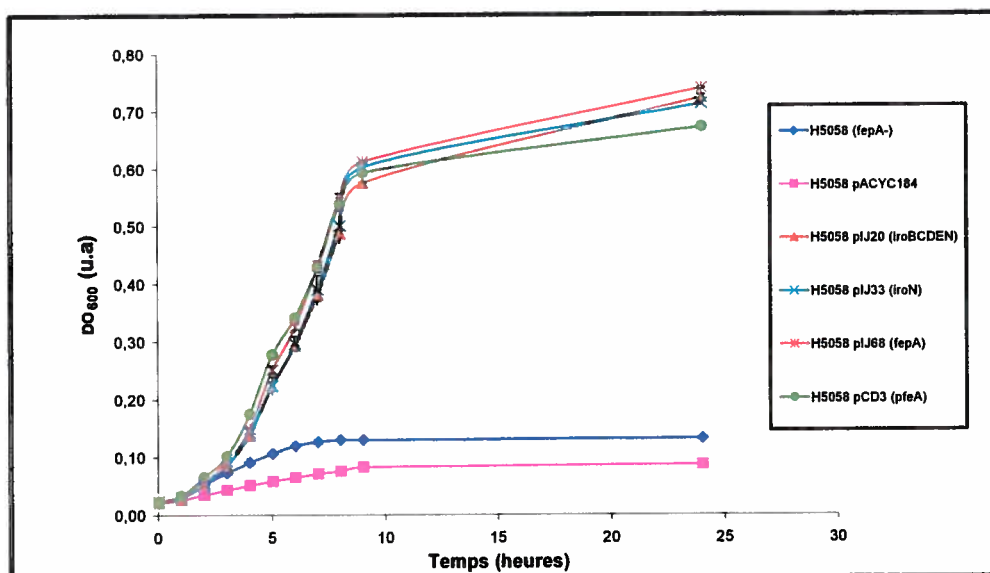


Figure 3.1 : Courbe de croissance de la souche H5058 et de ses dérivées dans le milieu NB avec 75 µM de dipyridyl.

Il est à remarquer dans la figure 3.1 que seules les souches complémentées avec les récepteurs IroN, PfeA et FepA sont capables de croître dans le milieu pauvre en fer. La souche mutante et celle complémentée avec le vecteur pACYC184 sont incapables de bien pousser dans le milieu. Ainsi, les trois récepteurs reconnaissent et incorporent l'entérobactine.

Un moyen simple et efficace de confirmer les résultats ci-haut, fut l'inoculation de la souche H5058 et de ses dérivées sur le milieu CAS. Le milieu CAS stimule la production, la sécrétion et l'utilisation de sidérophores par les bactéries, puisque le fer est très peu disponible. Ainsi, une souche mutée dans les gènes codant pour l'incorporation du sidérophore sécrètera énormément de sidérophore et sa croissance sera compromise sur ce milieu. En plus, le milieu CAS a la propriété de passer du bleu à l'orange en présence de sidérophore, permettant ainsi leur détection visuelle. Divers degrés d'orangé sont également notables lorsque les bactéries possèdent des mutations au niveau de l'incorporation ou de l'utilisation des sidérophores en comparaison avec les souches sauvages. De plus, la croissance des souches mutantes est aussi difficile lorsqu'elles sont cultivées sur ce milieu.

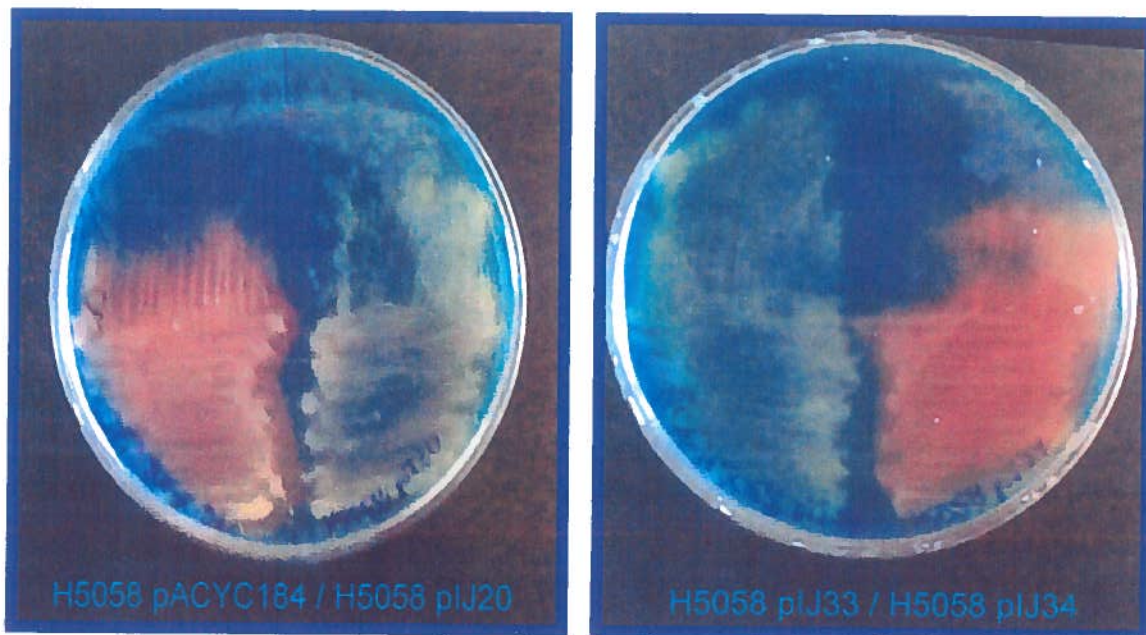


Figure 3.2 : Photos de la souche H5058 et de ses dérivéesensemencées sur milieu CAS.

La faible croissance et la sécrétion excessive d'entérobactine ont été des phénotypes observés chez les souches H5058, H5058 (pACYC184) et H5058 (pIJ34) qui possèdent des mutations au niveau du récepteur FepA de l'entérobactine et dont l'introduction du vecteur pACYC184 et les gènes *iroBCDE* n'a pas aidé à la croissance de la souche H5058 (figure 3.2). À l'opposé, une bonne croissance et une sécrétion modérée de l'entérobactine ont été observées chez les souches H5058 (pIJ20), H5058 (pIJ33), H5058 (pIJ68) et H5058 (pCD3) (figure 3.2). Ces souches possèdent sur leur vecteur plasmidique soit le gène *iroN*, le gène *fepA* ou le gène *pfeA* qui sont à l'origine de ces phénotypes. Les phénotypes obtenus démontrent clairement que les trois récepteurs incorporent l'entérobactine.

Par ailleurs, des différences significatives existent entre les trois récepteurs. En fait, *IroN* est homologue à 50 % à *FepA* et à 52 % à *PfeA*, tandis que *FepA* est homologue à 61 % à *PfeA*. Afin de mettre en lumière ces différences, des tests de sensibilité aux colicines B et Ia ont été effectués sur la souche H5058 et ses compléments. Les colicines B et Ia ont la propriété d'inhiber la croissance des bactéries qui les incorporent via les récepteurs *FepA* et *CirA* respectivement. Le but de cette expérience fut de vérifier l'incorporation de ces colicines par les récepteurs *FepA*, *IroN* et *PfeA*.

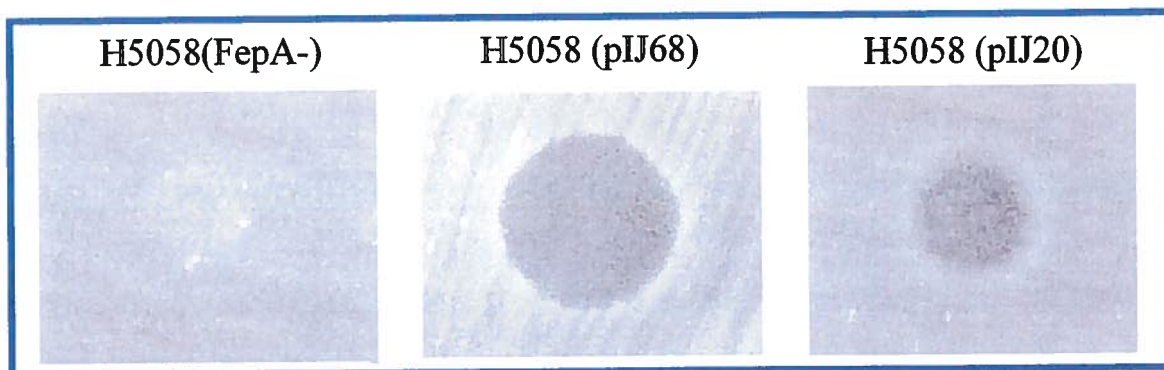


Figure 3.3 : Photos des souches H5058, H5058 (pIJ68) (*fepA*) et H5058 (pIJ20) (*iroBCDEN*) en présence de la colicine B.

Tableau 3.1 : Diamètres des zones d'inhibitions de croissance des souches BW25113 et H5058 mutantes et complémentées causées par la présence des colicines B et Ia.

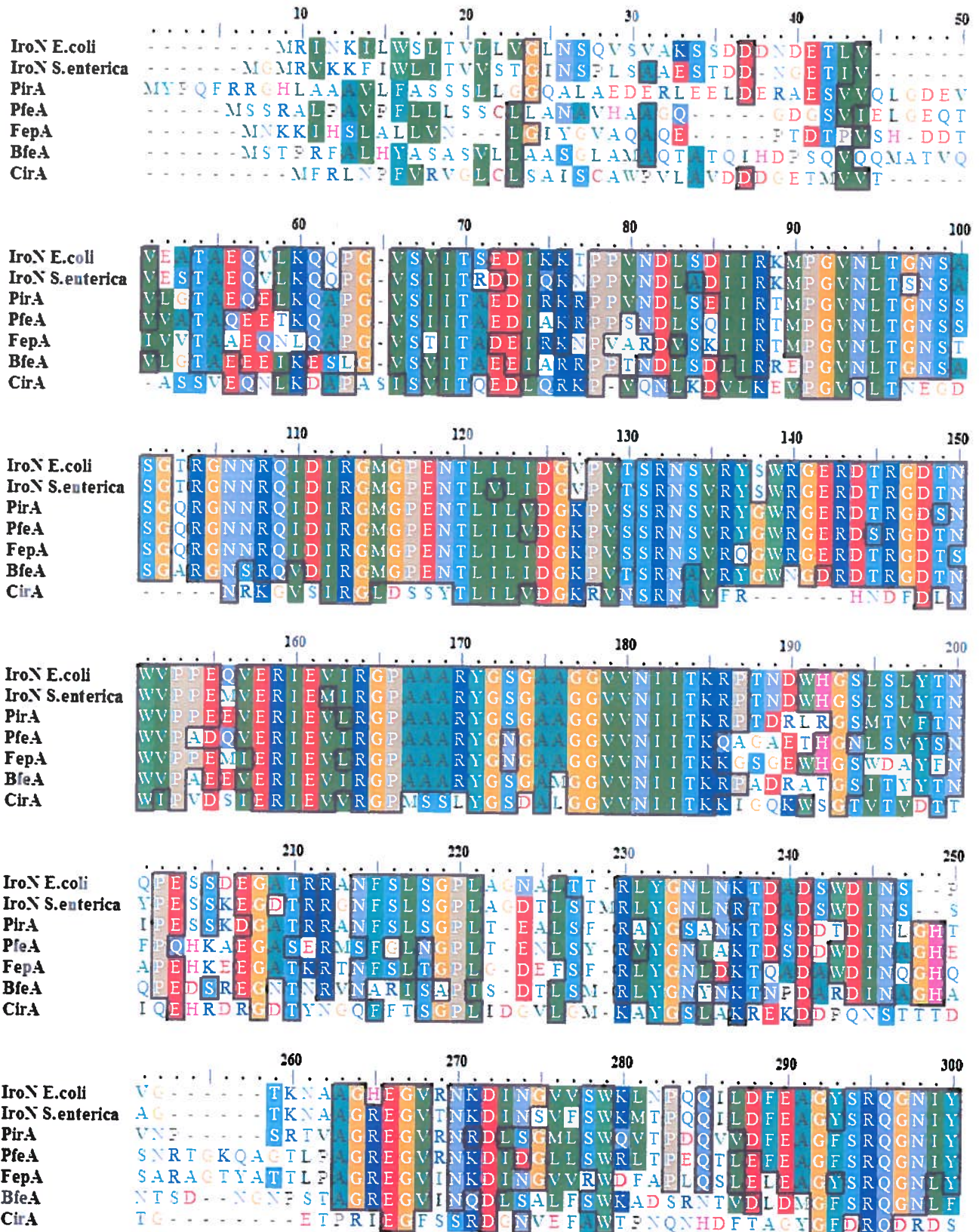
Souches	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)	
	colicine B	Colicine Ia
BW25113 (FepA +, CirA+)	19	14
QT744 (BW25113 FepA-)	0	14
QT746 (BW25113 CirA-)	19	9
H5058 (FepA-, CirA-)	0	0
H5058 (pACYC184)	0	0
H5058 (pIJ20) (<i>iroBCDEN</i>)	10	0
H5058 (pIJ33) (<i>iroN</i>)	9	0
H5058 (pIJ34) (<i>iroBCDE</i>)	0	0
H5058 (pIJ68) (<i>fepA</i>)	20	12
H5058 (pCD3) (<i>pfeA</i>)	0	0

Le tableau 3.1 expose les diamètres des zones d'inhibitions causées par les colicines B et Ia chez certaines souches sensibles. Tout d'abord, la souche BW25113, qui est une *E. coli* K-12 et dont les récepteurs FepA et CirA sont exprimés, démontre une zone d'inhibition de croissance en présence de colicine B et Ia. La souche QT744 (FepA-) est résistante à la colicine B, mais sensible à la colicine Ia. Toutefois, la souche QT746 (CirA-) démontre une sensibilité à la colicine B et à la colicine Ia, et ce, en absence du récepteur CirA, mais toutefois la zone d'inhibition de croissance est moindre que celle de la souche BW25113 possédant le récepteur CirA. De plus, le tableau 3.1 et la figure 3.3 démontrent que les phénotypes de résistance aux colicines B et Ia par les souches H5058, H5058 (pACYC184) et H5058 (pIJ34) (*iroBCDE*) sont dus à l'absence des récepteurs FepA et CirA, absence qui est causée par la mutation des gènes *fepA* et *cirA* au niveau du chromosome de la souche H5058. De plus, la présence du vecteur pACYC184 ou des gènes *iroBCDE* (pIJ34) n'a pas permis d'observer le phénotype inverse, soit l'inhibition de croissance. Le même phénotype est également observé chez la souche H5058 (pCD3) qui possède toutefois le récepteur PfaA. Par contre, la complémentation par le gène *iroN* a causé une inhibition de croissance due à l'acquisition de la colicine B par IroN. À l'opposé, l'introduction du gène *iroN* dans la souche n'a pas causé une inhibition de croissance en présence de colicine Ia,

puisque IroN ne semble pas incorporer cette colicine. En plus, il est à noter que la présence du gène *fepA* sur un plasmide permet l'acquisition des deux colicines, mais la colicine B semble être acquise plus facilement. Finalement, la zone d'inhibition de croissance créée par l'incorporation de la colicine B par FepA de la souche H5058 (pIJ68) est le double de celle produite par la souche H5058 (pIJ33) (*iroN*).

Les phénotypes observés par les expériences précédentes confirment que les trois récepteurs FepA, IroN et PfeA peuvent incorporer l'entérobactine, mais qu'ils présentent des différences quant à leur sensibilité aux colicines B et Ia. Ces différences peuvent être mieux expliquées par des analyses bioinformatiques des séquences protéiques.

Le récepteur IroN de la souche χ 7122 est en fait conservé chez plusieurs entérobactéries, telles que *E. coli* CFT073 (UPEC) (99%/99 %) (NP_753164), *Shigella dysenteriae* (98%/99 %) (AR13270), *Klebsiella pneumoniae* (92%/95 %) (NP_943391) et *Salmonella enterica* (82%/92 %) (AAC46183). Néanmoins, IroN présente plusieurs homologies avec d'autres récepteurs de sidérophores, notamment FepA (50%/67 %) (NP_415116), PfeA (52%/68 %) (AAA25928), CirA (32%/47 %) (NP_416660), PirA (59%/76 %) (AAC06224) et BfeA (54%/70 %) (NP_884726). Les récepteurs CirA, PirA et BfeA proviennent respectivement de *E. coli* K-12, *P. aeruginosa* et *Bordetella parapertusis*.



	310	320	330	340	350
IroN <i>E.coli</i>	GDTQNSSSS	VTESLAKS	GK E T N R L Y R Q N Y	G I T H N G I	I W D W G Q S R F - G V Y
IroN <i>S.enterica</i>	GDTQNSNSN	VTKSLAQS	GR E T N R L Y R Q N Y	G L T H N G I	I W G W G Q S R L - G F Y
PirA	GDTQNNN	TANTQQLADD	GA E T N R M Y R E N Y	A I T H N G T	W S F G T S R F - V A Q
PfeA	TGDTQNTNS	N Y V K Q M L - -	G H E T N R M Y R E T	Y S V T H R G E	W D F G S S L A - Y L Q
FepA	GDTQNTNS	D S Y T R S K Y - -	G D E T N R L Y R Q N Y	A L T W N G C	W D N G V I T S N W V Q
BfeA	GDTMNNANS	D F S D S L Y - -	G K E T N A M Y R E N Y	L T H R G V	Y D W G T S R A - S V C
CirA	D - - - - -	- - - - -	S L D K N R L E R Q N Y S	V S H N G R	W D Y G T S E L K Y Y G

	360	370	380	390	400
IroN <i>E.coli</i>	Y E K T N N T R M N E G L S	G G G E G R I L - -	E E K F T T N R L S	S W R T S G E L N I P L N V M	
IroN <i>S.enterica</i>	Y E K T D N T R M N E G L S	G G G E G R I T - -	N D Q T F T T N R L T S Y R T S	C G E V N V P V I W L	
PirA	Y D S T R N Q P S G G G L A G	S V E G Q I G - -	D R S F S A S K L E N Y R L S	C G E L N L P L H A L	
PfeA	Y E K T R N S R I N E G L A G	G G I E G I F D F N N A G -	F Y T A I L R D L T A H C	G E V N L P L H L G	
FepA	Y E H T R N S R I P E G L A G	G G I E G K F N E K - T Q D	F V D I D L D D V M L H S	E V N L P I D F L	
BfeA	Y D Y T R N A R Q R E G L A G	G G P E G A P T - -	G G - G G - T A R L K N W R A	A E A S V P F H L G	
CirA	E K V E N K N P G N S - - - -	- - - - -	S P I T S E S N T V D C	K Y T L P L T - A	

	410	420	430	440	450
IroN <i>E.coli</i>	V D Q T L T V G E F W N R D K L D D P S S T	S L T V N D S D I S G I S G - -	S A A D R S S K N H S Q		
IroN <i>S.enterica</i>	F E Q T L T V G E F W N R D E L N D P S S T	S L T V K D S N I A G I P G - -	S A A N R S S K N K S E		
PirA	F E Q V L T V G E F W N K E T L N D P S S L	K Q F V G S D S L F G T P - -	A A G S R S P K S K A E		
PfeA	Y E Q T L T L G S E W T E Q K L D D P S S N	T Q N - - T E E L G S I P G L	G K N R S S S S S R		
FepA	V N Q T L T L G E F W N Q Q R M K D L S S N	T Q A L T C T N T I G A I D G V	S T T D R S F Y S K A E		
BfeA	F E Q V A T V G V E W L R E S L E D P - G	T R Q T Y T G G A I G T - -	- P A D R D P K S R Q T		
CirA	I N Q F L T V G E F W R H D K L S D A V N - - - -	- - - - -	L T G G T S S K T S S		

	460	470	480	490	500
IroN <i>E.coli</i>	I S A L Y I E D N I E F V F G T N I I P G L R F D Y L S D S C G N F S P S L N L S Q E L G D Y F K V				
IroN <i>S.enterica</i>	I S A L Y V E D N I E P M A G T N I I P G L R F D Y L S E S G S N F S P S L N L S Q E L G E F V K V				
PirA	I R A L Y V E D N I E L R F G T M L T P G L R L D D H S D F G L N W S P S L N A S Q L G E F V T V				
PfeA	I F S L F A E D N I E L M F G T M L T P G L R W D H H D I V G D N W S P S L N L S H A L T E R V T L				
FepA	I F S L F A E N N M E L I D S T I V T P G L R F D H H S I V G N N W S P L N I S Q L G D D F T L				
BfeA	S S L F A E D N I E I D E R T M L T P G V R L D H N S E F G S N W S P S L N A S Y A V T D A L K L				
CirA	Q Y A L F V E D E W R I F E F L A L T I G V R M D D H E T Y G E H W S P R A Y L V Y N A T D T V T V				

	510	520	530	540	550
IroN <i>E.coli</i>	K A G V R I F K A P N L Y Q S S E G Y L L Y S K G N G C F K D I T - S G G C Y L I G N K D L D P E				
IroN <i>S.enterica</i>	K A G I A R A F K A P N L Y Q T S E G Y L L Y S K G N G C F K D I T - S G G C Y L V G N K N L D P E				
PirA	K A G I A R A F K A P N L Y Q S N P N Y L L Y T R G N G C F I Q T S - S G G C Y L V G N E N L D A E				
PfeA	K A G I A R A Y K A P N L Y Q L N P D Y L L Y S R G Q G C Y Q S T - - S C Y L R C N D C L K A E				
FepA	K M G I A R A Y K A P S L Y Q T N P N Y I L Y S K G Q G C Y A S A G - - G C Y L Q G N D D L K A E				
BfeA	K G G I A R A Y K A P N L Y Q S N P N Y L L Y S R G N G C L A S Q A N T N G C Y L V G N E D L S P E				
CirA	K E G W A T A F K A P S L L Q L S E P D W T S N S C R G - - - - A C K I V G S P D L K P E				

	560	570	580	590	600
IroN <i>E.coli</i>	I S V N K E I G L E F T - - - - W E D Y H A S V T Y F R N D Y Q N K I V A G D N V I G Q T I S G -				
IroN <i>S.enterica</i>	I S I N K E I G L E F T - - - - V D D Y H A S V T Y F R N D Y Q N K I V A G D Q I I G R S A S G -				
PirA	T S V N K E L G I E F R - - - - R D G W V A G L T Y F R N D Y K N K I V A P L D V M G Q I T G T G -				
PfeA	T S V N K E L G I E Y S - - - - H D C L V A G L T Y F R N D Y K N K I E S G L S F V D H A S G G K				
FepA	T S I N K E I G L E F K - - - - R D G W L A G V I W F R N D Y R N K I E A G Y V A V G Q N A V G -				
BfeA	T S V N K E I G F E Y D - - - - P G T W R T S M A Y F R N D Y R N K I V A G I D V Q Y R L A N G -				
CirA	T S E S W E L G L Y Y M G E E G W L E G V E S S V T Y F R N D V K D R I S I S R T S D V N A A E G Y				

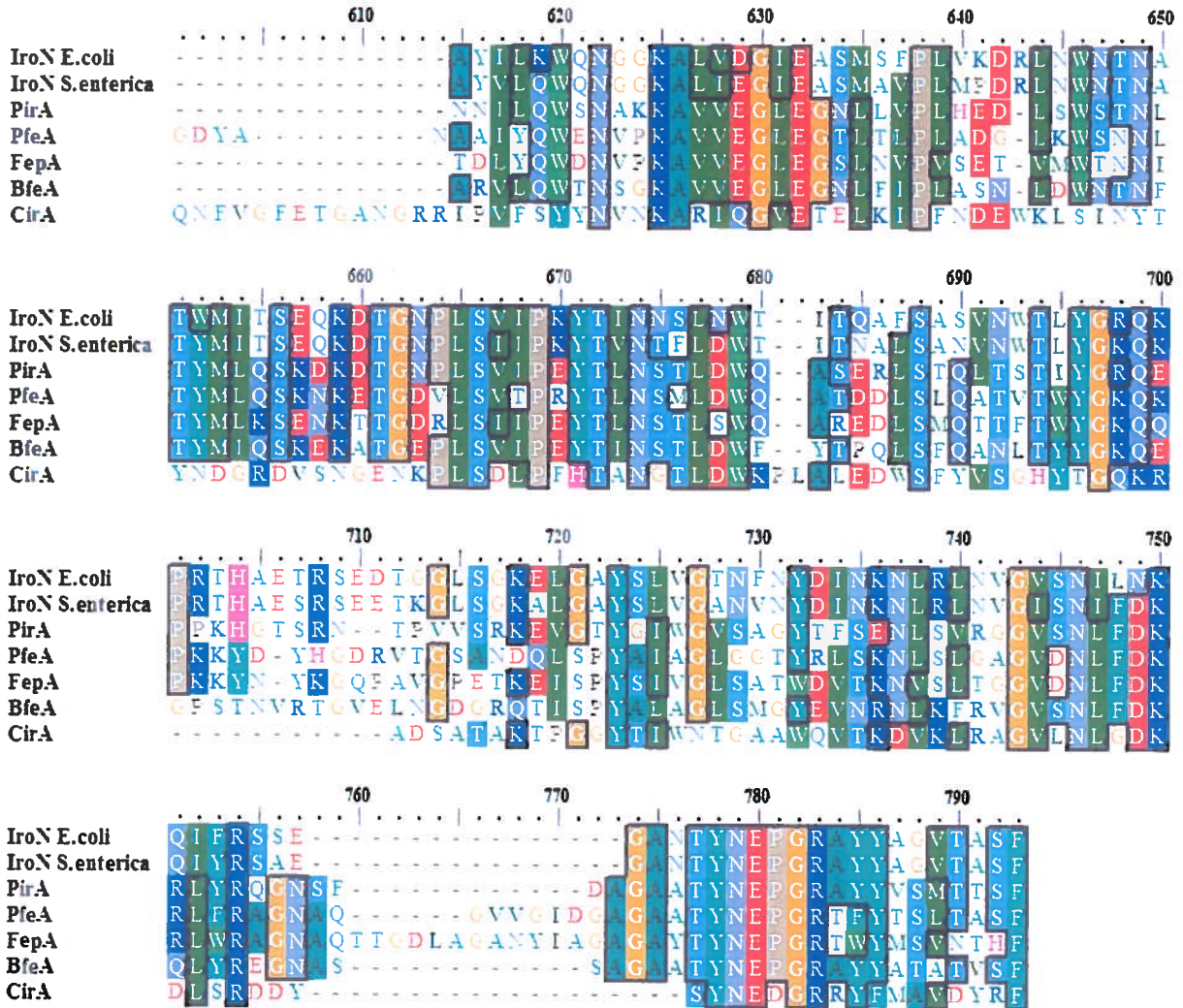
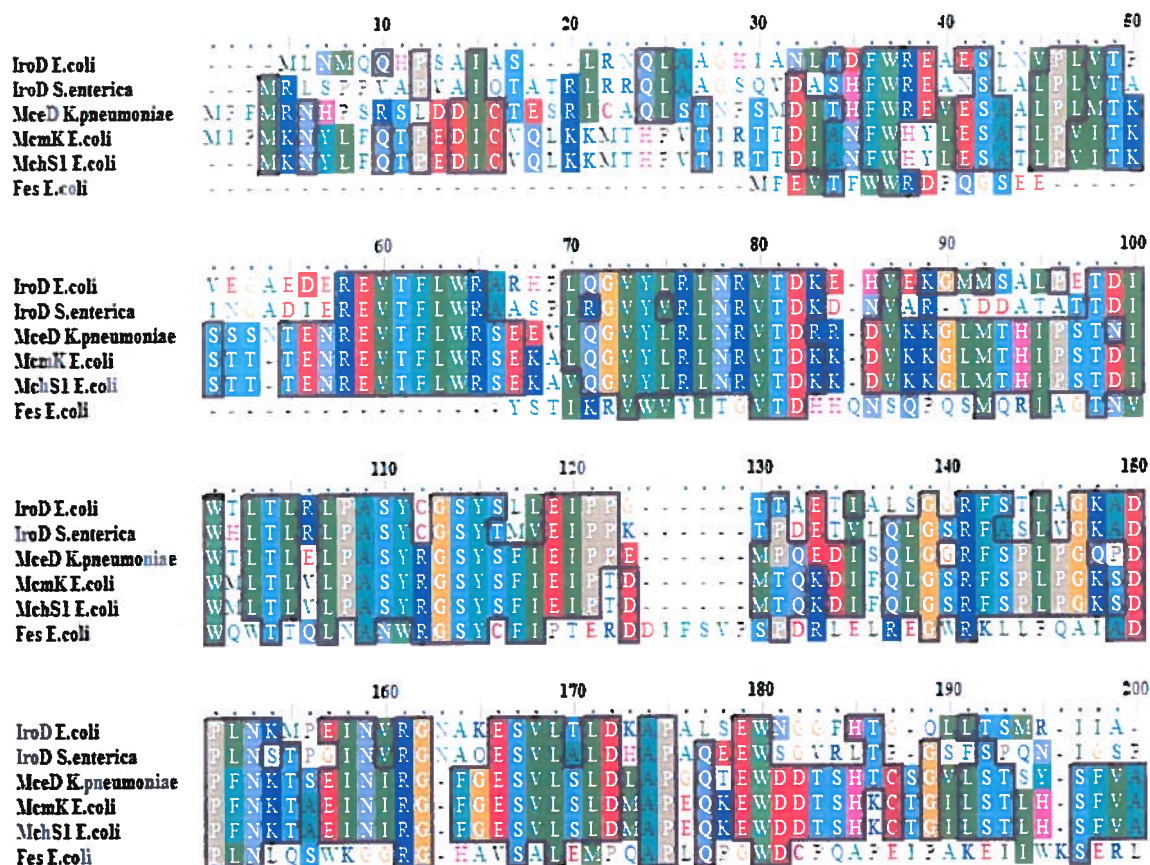


Figure 3.4: Alignement des séquences protéiques des récepteurs IroN de *E. coli* χ 7122 (AAN76093), IroN de *S. enterica* (AAC46183), FepA de *E. coli* K-12 (NP_415116), PfeA de *P. aeruginosa* (AAA25928), CirA de *E. coli* K-12 (NP_416660), PirA de *P. aeruginosa* (AAC06224) et BfeA de *B. parapertusis* (NP_884726).

La figure 3.4 démontre les alignements des séquences protéiques de quelques récepteurs homologues à IroN. Il est à noter que IroN fait partie de la superfamille des porines de la membrane externe TonB-dépendante. Cette superfamille regroupe aussi les récepteurs de la membrane externe FepA, CirA, FecA, FhuA et BtuB. De plus, les régions N-terminales des protéines sont très conservées à travers les différents récepteurs. En fait, c'est dans cette région que se situe le « plug domain » du récepteur FepA (Usher *et al.*, 2001). Il se retrouve entre les acides aminés 3 et 150 (Vakharia et Postle, 2002). Ce domaine est donc très préservé parmi ces récepteurs.

3.2 La caractérisation des gènes *iroD* et *iroE*

La caractérisation du système *iro* s'est poursuivie par l'étude des gènes *iroD* et *iroE*. Tout d'abord, la protéine IroD est homologue à 28 % et similaire à 44 % avec le gène qui code pour l'estérase Fes de l'entérobactérie de la souche *E. coli* K-12 (NP_415117). IroD possède en fait un domaine conservé de la famille des estérases putatives. Cette estérase putative a aussi plusieurs homologues chez différentes souches pathogènes. En effet, la séquence protéique de IroD provenant de la souche *E. coli* χ 7122 est à 99 % identique et similaire à celle de *E. coli* CFT073 (NP_753166) et de *Shigella dysenteriae* (AAR13268). Toutefois, chez *Klebsiella pneumoniae*, IroD est identique et similaire à 82 %/90 % respectivement (NP_943392), de même que chez *Salmonella enterica* (66 %/78 %) (AAC46181). Par ailleurs, la séquence protéique de IroD présente des homologies avec des protéines de bactériocines, notamment avec MceD (57 %/71 %) de *K. pneumoniae* (AAL08397), McmK (58 %/71 %) de *E. coli* (CAD56179) et MchS1 (57 %/70 %) de *E. coli* (CAG25571).



Par ailleurs, la séquence protéique de IroE de la souche *E. coli* χ 7122 est très homologue à celles retrouvées chez la souche uropathogène CFT073 (98 %/99 %) (NP_753165) et chez *Shigella dysenteriae* (99 %/99 %) (AAR13269). Cette protéine est aussi homologue à 61 % et similaire à 72 % à IroE de *Salmonella typhimurium* (NP_461703). IroE possède en effet un peptide signal en N-terminal et qui est clivé au 32^e acide aminé selon les méthodes d'analyse « Neural Network » et « Hidden Markov models ». C'est pourquoi elle a été nommée hydrolase périplasmique. De plus, tout comme IroD, IroE fait également partie de la famille des estérases putatives, sans toutefois être homologue à IroD ou à Fes. En outre, aucune autre protéine connue n'est similaire à IroE.

Suite à l'analyse bioinformatique des séquences protéiques de ces estérases, plusieurs expériences ont été réalisées afin de vérifier l'activité enzymatique présumée de ces deux protéines. Ainsi, suite à la construction des plasmides pIJ48 (*iroDE*), pIJ52 (*iroD*) et pIJ54 (*iroE*) et leur introduction dans la souche AN272 mutante pour l'estérase Fes, la croissance de chaque souche a été mesurée par spectrophotométrie à des intervalles d'une heure. La souche AN272 a été choisie puisque la mutation dans le gène *fes* empêche la souche de dégrader le complexe ferri-entérobactine et ainsi restreint l'utilisation du fer. Cette mutation contraint donc la croissance de la bactérie dans un milieu pauvre en fer, puisque le fer ne lui est pas accessible. Ainsi, une reprise de croissance par les souches complémentées avec les gènes *iroD* et/ou *iroE* mettrait en évidence l'activité enzymatique de dégradation des liens esters présents sur les molécules d'entérobactine. Quelques contrôles, telles que AN272 (pACYC184) et AN272 (pIJ35) (*fes*, *fepA* et *entD*) ont été également soumis à l'expérience.

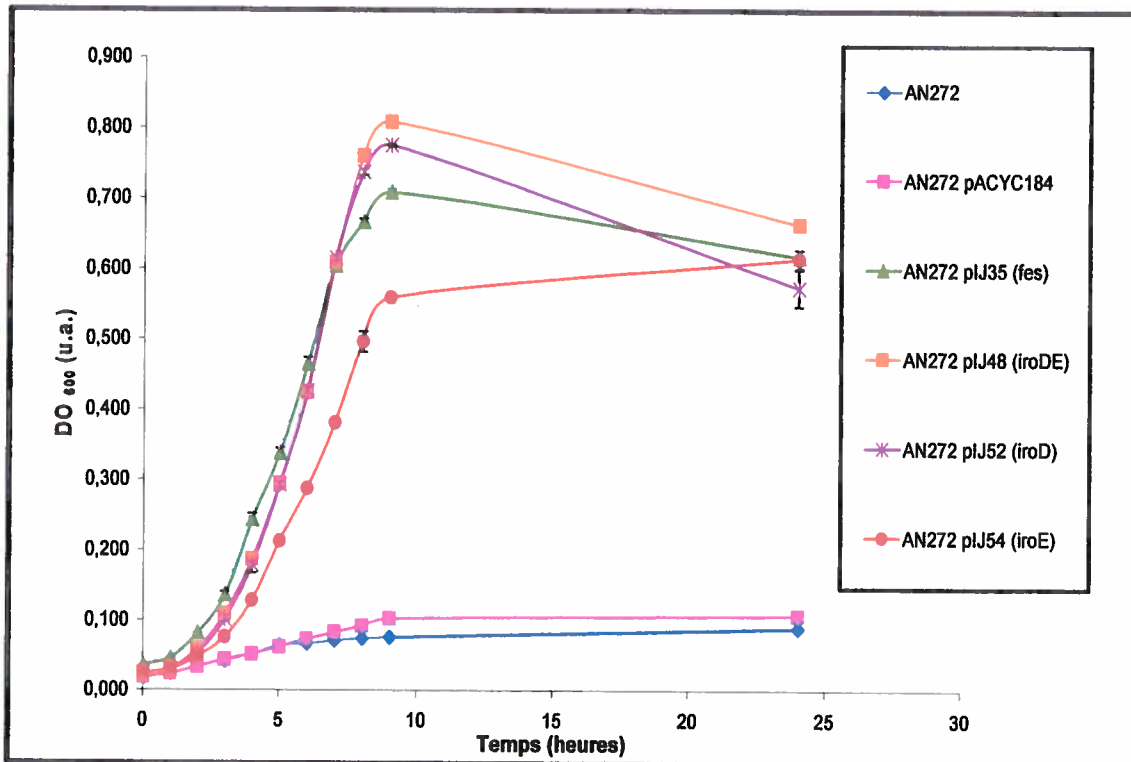


Figure 3.7 : Courbes de croissances de la souche AN272 et ses dérivées dans le milieu NB avec 50 μ M de dipyrityl.

La figure 3.7 démontre que la croissance des souches AN272 et AN272 (pACYC184) dans le milieu est très faible. Par contre, l'introduction des gènes *fes*, *iroD* et/ou *iroE* dans la souche permet une bonne croissance de la bactérie. Cependant, il est à noter sur cette figure que la complémentation par le gène *iroE* permet à la souche AN272 de croître dans le milieu, par contre la souche accuse un certain retard par rapport à la croissance des souches complémentées par *fes* et *iroD*. Toutefois, cette lenteur initiale n'est plus décelable après 24 h de culture.

Afin de confirmer les résultats ci-haut, la souche AN272 et ses dérivées ont été ensemencées sur des boites CAS (figure 3.8). Les souches AN272 et AN272 (pACYC184) présentaient des phénotypes de faible croissance et de forte sécrétion de sidérophores. En outre, les souches AN272 (pIJ35) (*fes*) et AN272 (pIJ52) (*iroD*) ont bien poussé sur le milieu et ont sécrété de façon modérée l'entérobactine. Par ailleurs, la souche AN272 (pIJ48) (*iroDE*) a cru plus difficilement sur le milieu que la souche AN272 (pIJ52) (*iroD*), mais présente un phénotype de sécrétion similaire à cette dernière. Finalement, la souche

AN272 (pIJ54) (*iroE*) eu des difficultés à bien croître sur le milieu et a secrété fortement l'entérobactine. Cependant, la croissance de la souche AN272 (pIJ54) a été tout de même plus forte que les souches AN272 et AN272 (pACYC184).



Figure 3.8 : Photo des souches AN272 (pACYC184) (gauche) et AN272 (pIJ52) (droite) sur milieu CAS.

La caractérisation des gènes *iroD* et *iroE* s'est poursuivie par la détection des produits de dégradation de l'entérobactine. L'expérience a consisté à extraire à l'acétate d'éthyle les surnageants de culture bactérienne et de détecter, par chromatographie liquide couplée au spectromètre de masse (CL/SM), les produits de dégradations de l'entérobactine (monomère de DHBS, dimère de DHBS et trimère de DHBS). Les surnageants des souches AN272, AN272 (pACYC184), AN272 (pIJ35) (*fes*, *fepA* et *entD*), AN272 (pIJ48) (*iroDE*), AN272 (pIJ52) (*iroD*) et AN272 (pIJ54) (*iroE*) ont été soumis à l'expérience. Le profil chromatographie obtenu est sensiblement le même pour toutes les cultures analysées, toutefois, la quantité de chaque produit varie selon les souches (figure 3.9).

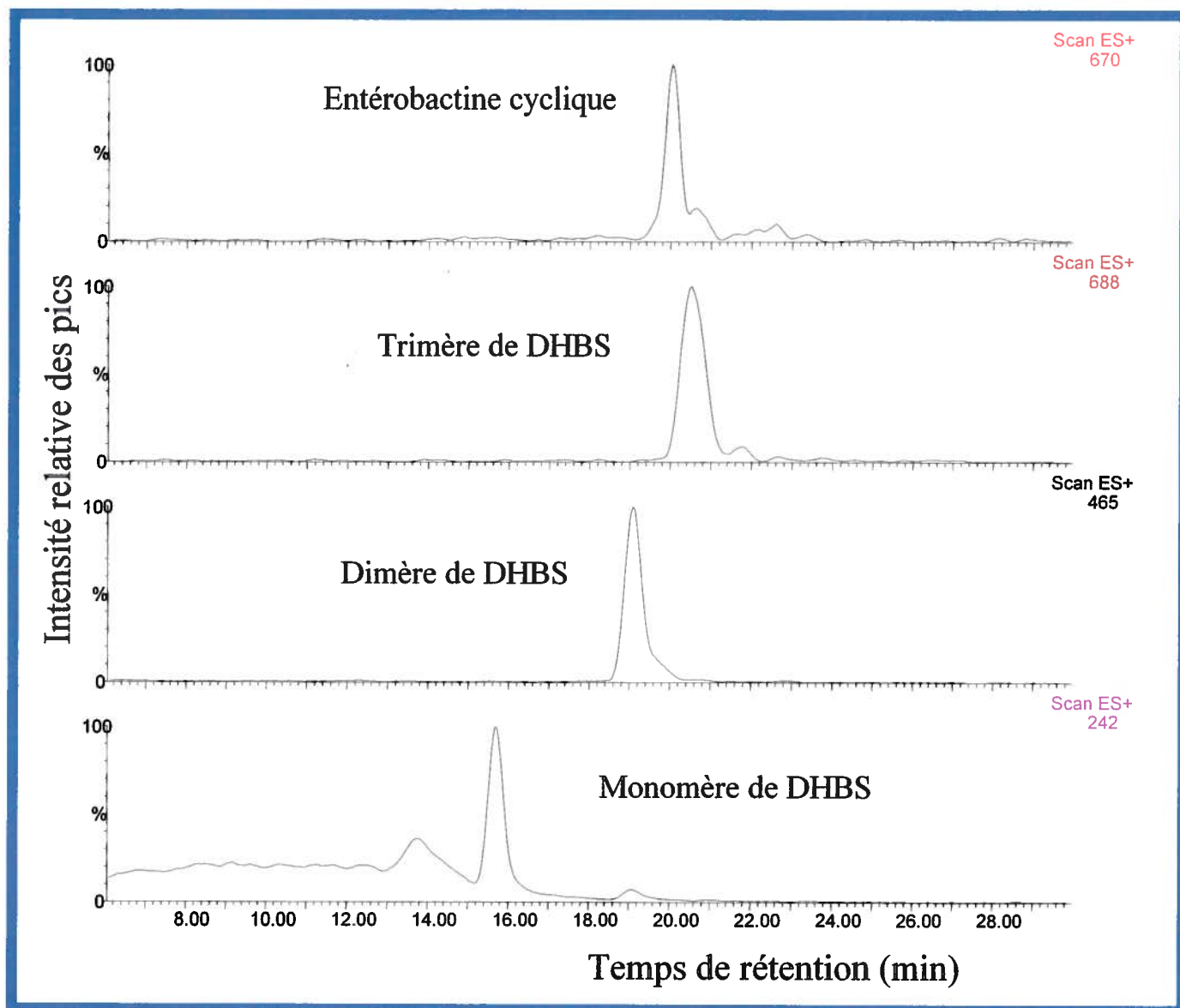


Figure 3.9 : Profils chromatographiques de l'extraction à l'acétate d'éthyle du surnageant de la culture AN272 (pIJ54) (*iroE*) détectés par CL/SM. Les pics détectés proviennent d'un même échantillon et l'échelle de temps de rétention est valable pour les quatre profils.

La quantification des pics chromatographiques s'est effectuée en intégrant l'aire sous la courbe de chaque pic, une fonction qui est fournie par le programme d'analyse MassLynx. La valeur obtenue pour chaque pic intégré est proportionnelle à la quantité de produits détectée dans 1 ml de surnageant de culture. Bien que la quantité en unité de mesure (mg ou mM) de chaque produit ne puisse pas être déterminée, les valeurs obtenues peuvent être comparées.

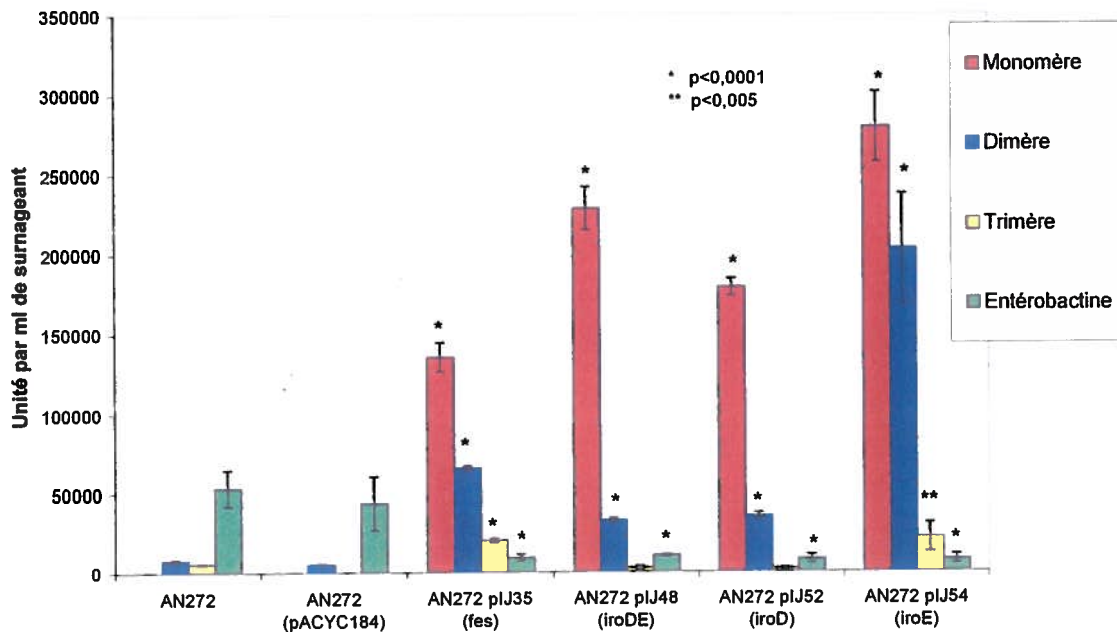


Figure 3.10 : Quantification des produits de dégradation de l'entérobactine retrouvés dans les surnageants de cultures de la souche AN272 et de ses dérivées après 18 h d'incubation. Quantification basée sur l'intégration de l'aire sous la courbe des pics de chaque produit détecté par le spectromètre de masse. Les valeurs des souches complémentées ont été comparées à celles des souches mutantes, soit AN272 et AN272 (pACYC184), afin de trouver les différences significatives.

Il est à noter, à partir de la figure 3.10, que les quantités de monomère et de dimère de DHBS ont été significativement plus élevées chez les souches AN272 complémentées par les gènes *fes*, *iroD* ou *iroE* en comparaison avec les souches AN272 et AN272 (pACYC184). Les quantités d'entérobactine sécrétées par les souches AN272 et AN272 (pACYC184) ont été significativement plus élevées que chez les souches possédant un des trois gènes à l'étude. De plus, la présence de trimère a été plus élevée chez les souches AN272 (pIJ35) (*fes*, *fepA* et *entD*) et AN272 (pIJ54) (*iroE*) comparativement aux souches mutantes. Aussi, les quantités de produits de dégradation de l'entérobactine sont similaires entre les souches AN272 (pIJ48) (*iroDE*) et AN272 (pIJ52) (*iroD*). Finalement, la présence du gène *iroE* chez la souche AN272 a produit énormément de monomère et de dimère de DHBS en comparaison avec la souche AN272 complémentée avec les gènes *fes* ou *iroD*.

3.3 La production des salmochelines

La production des salmochelines par les gènes *iroBCDEN* n'est pas totalement comprise. En fait, parmi les gènes *iro*, nul ne sait quel est le rôle exact des gènes nécessaires à la production des salmochelines et ceux nécessaires à l'établissement d'une infection chez le modèle aviaire et/ou pendant l'infection systémique. Pour répondre à ces questions, divers plasmides portant un ou plusieurs gènes *iro* ont été construits et introduits dans la souche χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-). Des expériences d'isolements des salmochelines et de l'entérobactine et de ses produits de dégradations ont été effectuées à l'aide de colonne anionique DE52 DEAE-cellulose. Par la suite, la détection des sidérophores a été effectuée par analyse en CL/SM. Les surnageants de culture des souches χ 7301 (Tsh- et Aéro-), χ 7306(Tsh-, Aéro- et Iro-) et χ 7306 complémentées avec les plasmides pIJ20 (*iroBCDEN*), pIJ33 (*iroN*), pIJ34 (*iroBCDE*), pIJ37 (*iroBDEN*) et pIJ38 (*iroBDE*) ont été analysés. La souche χ 7301 a été choisie à titre de souche de référence au lieu de χ 7122, et ce, afin d'éliminer la production et la sécrétion de l'aérobactine, ce qui aurait pu diminuer la production et la détection des salmochelines dans un milieu pauvre en fer. Le profil chromatographique de chaque surnageant de culture analysé avait sensiblement le même motif selon la détection des différentes salmochelines (figure 3.11).

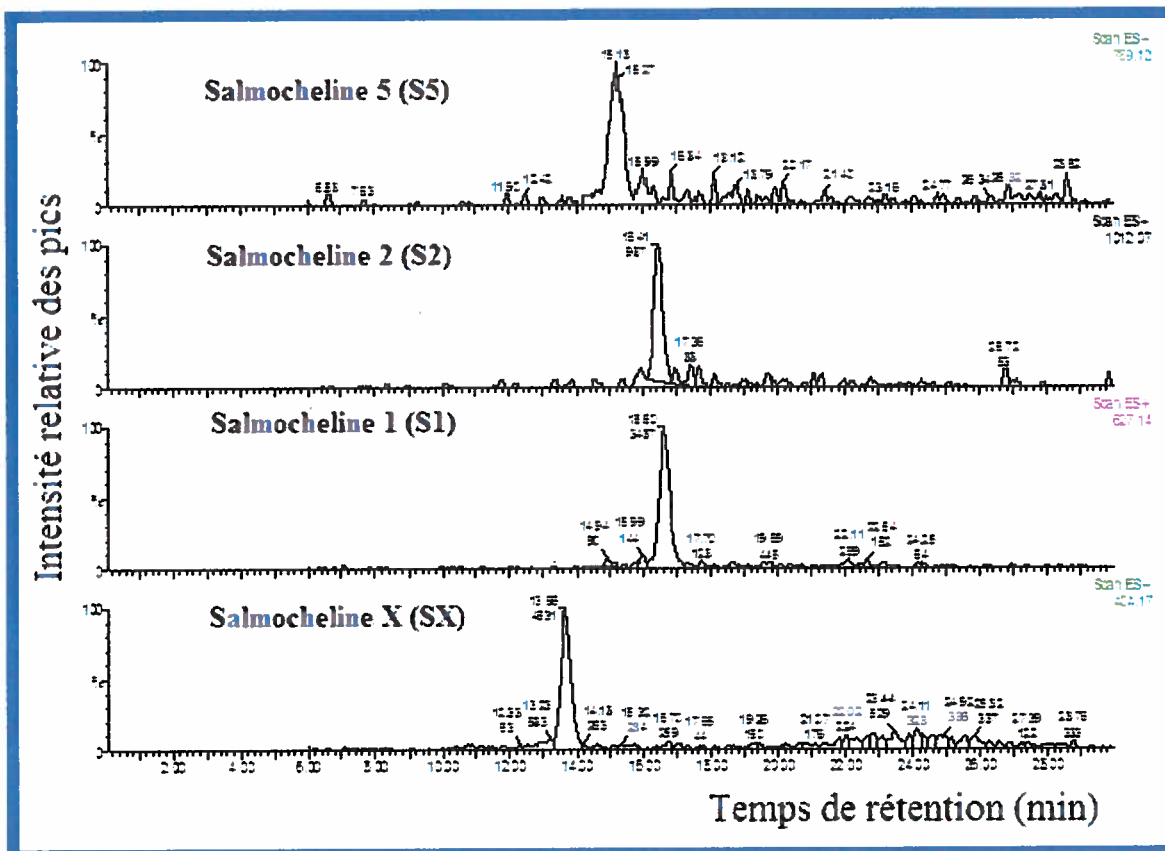


Figure 3.11 : Chromatogrammes des salmochelines SX, S1, S2 et S5 provenant de la culture de χ 7306 (pIJ34) (*iroBCDE*) détectées à l'aide du spectromètre de masse par électronébulisation en mode positif. L'échelle de temps de rétention est valable pour les quatre chromatogrammes.

La quantification des pics chromatographiques s'est effectuée en intégrant l'aire sous la courbe de chaque pic à l'aide du programme d'analyse MassLynx. Chaque valeur obtenue a été divisée par un facteur de concentration et multiplié par 50. Le facteur de concentration a été calculé pour chaque échantillon et il se résume en la division du volume initiale de surnageant passée sur la colonne de DE52 DEAE-cellulose, par le volume d'éluion recueilli. La multiplication par 50 résulte du fait que seulement 20 μ l de chaque échantillon est analysé par CL/SM. Ainsi, pour exprimer les valeurs obtenues pour 1 ml de culture, il faut multiplier les données par 50 (1000 μ l/20 μ l).

Exemples de calcul :

Facteur de concentration = volume initial/volume d'élution

$$F_c = 100 \text{ ml} / 10 \text{ ml} = 10 \text{ ml}$$

Quantification = valeur intégrée/facteur de concentration

$$\text{Quantification} = 5000 / 10 \text{ ml} = 500 \text{ unité / ml}$$

De cette façon, la quantité de chaque produit détectée dans chaque échantillon a été calculée et toutes les valeurs obtenues peuvent être comparées. Cette quantification ne peut s'écrire en unité de mesure concrète (mg ou mM).

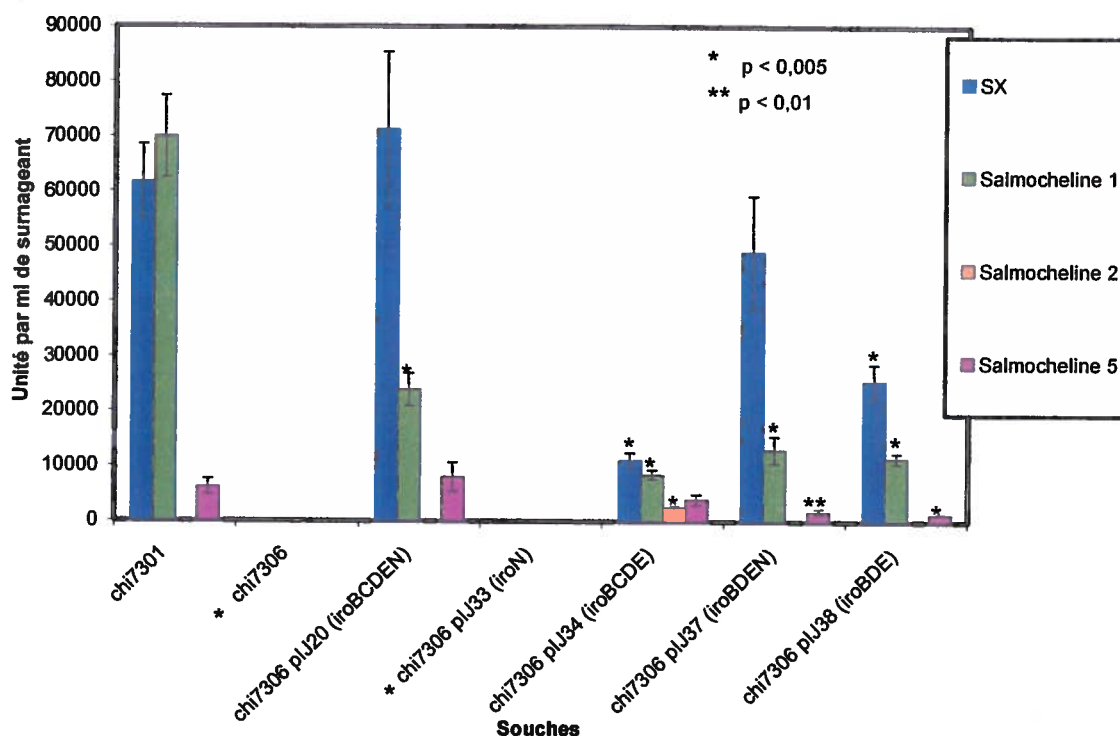


Figure 3.12 : Quantification des différentes salmochelins SX, S1, S2 et S5 détectées dans les surnageants des cultures de χ 7301, χ 7306, χ 7306 (pIJ20), χ 7306 (pIJ33), χ 7306 (pIJ34), χ 7306 (pIJ37) et χ 7306 (pIJ38). Les quantités de salmochelins détectées chez les souches mutantes et complémentées ont été comparées avec celles de la souche χ 7301 et ce, afin de trouver les différences significatives.

Le graphique 3.12 démontre la quantité de salmochelines produits par différentes souches mutantes et complémentées. Chez toutes les souches, sauf pour les souches mutantes $\chi 7306$ et $\chi 7306$ (pIJ33) (*iroN*), les salmochelines SX, S1 et S5 ont été détectées. La salmocheline SX a été retrouvée en plus grande quantité chez les souches $\chi 7301$ et $\chi 7306$ (pIJ20) (*iroBCDEN*), mais a été tout de même détectée chez les souches $\chi 7306$ (pIJ34) (*iroBCDE*), $\chi 7306$ (pIJ37) (*iroBDEN*) et $\chi 7306$ (pIJ38) (*iroBDE*). La salmocheline S1 est définitivement plus présente dans le surnageant de la souche $\chi 7301$, bien qu'elle y soit détectée en plus petite quantité chez les souches $\chi 7306$ (pIJ20), $\chi 7306$ (pIJ34), $\chi 7306$ (pIJ37) et $\chi 7306$ (pIJ38). La salmocheline S2 n'a été retrouvée que dans le surnageant de culture de la souche $\chi 7306$ (pIJ34). La salmocheline S5 était en plus grande quantité dans les cultures des souches $\chi 7301$, $\chi 7306$ (pIJ20) et $\chi 7306$ (pIJ34). Finalement, la salmocheline S4 n'a pas été trouvée dans aucun surnageant de culture. Ainsi, l'absence des gènes *iroN* et/ou *iroC* affecte peu la présence des salmochelines dans le surnageant de culture, cependant l'omission des gènes *iroBCDE* élimine la production des salmochelines.

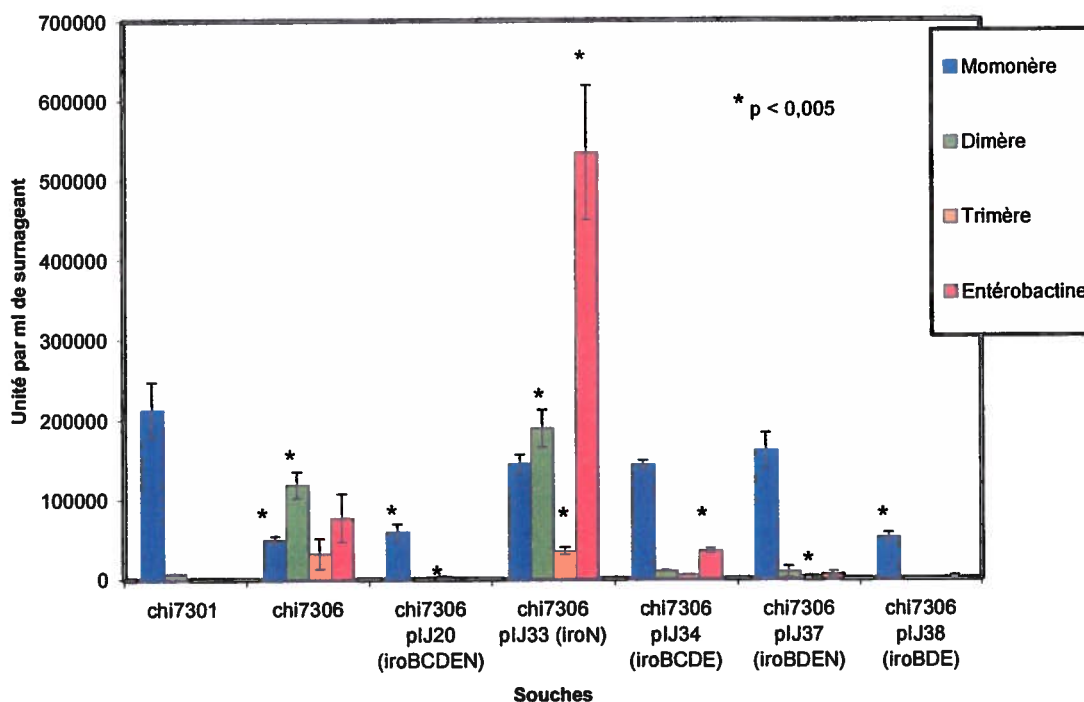


Figure 3.13 : Quantification de l'entérobactine et de ses produits de dégradation détectés dans les surnageants de cultures des souches $\chi 7301$, $\chi 7306$, $\chi 7306$ (pIJ20), $\chi 7306$ (pIJ33), $\chi 7306$ (pIJ34), $\chi 7306$ (pIJ37) et $\chi 7306$ (pIJ38).

L'entérobactine et ses produits de dégradations ont été isolés chez toutes les cultures bactériennes (figure 3.13). Toutefois, les quantités retrouvées des diverses molécules diffèrent entre elles. Notamment, il est à remarquer la très grande quantité d'entérobactine détectée dans le surnageant de culture de la souche $\chi 7306$ (pIJ33). Le profil de détection des souches $\chi 7301$, $\chi 7306$ (pIJ20), $\chi 7306$ (pIJ34), $\chi 7306$ (pIJ37) et $\chi 7306$ (pIJ38) sont similaires, démontrant ainsi que l'absence de *iroN* et/ou *iroC* affecte peu la synthèse, sécrétion et dégradation de l'entérobactine. Finalement, il est à noter la similarité des profils des souches $\chi 7306$ et $\chi 7306$ (pIJ33) qui ne produisent pas de salmochelines, mais génèrent beaucoup de dimère, trimère et d'entérobactine.

L'importance du système Iro pour la virulence de la souche $\chi 7122$ chez le modèle aviaire a été préalablement démontrée. Cependant, nul ne sait si la présence de tous les gènes *iro* ou seulement quelques gènes spécifiques sont nécessaires pour l'établissement de l'infection. Ainsi, des infections de poulets ont été effectuées en utilisant la souche $\chi 7306$ complémentée avec les plasmides pIJ20 (*iroBCDEN*), pIJ33 (*iroN*) et pIJ34 (*iroBCDE*). Tout d'abord, la présence des souches dans le sang à 6 h, 24 h et 48 h a été déterminée par prélèvement sanguin et compte bactérien.

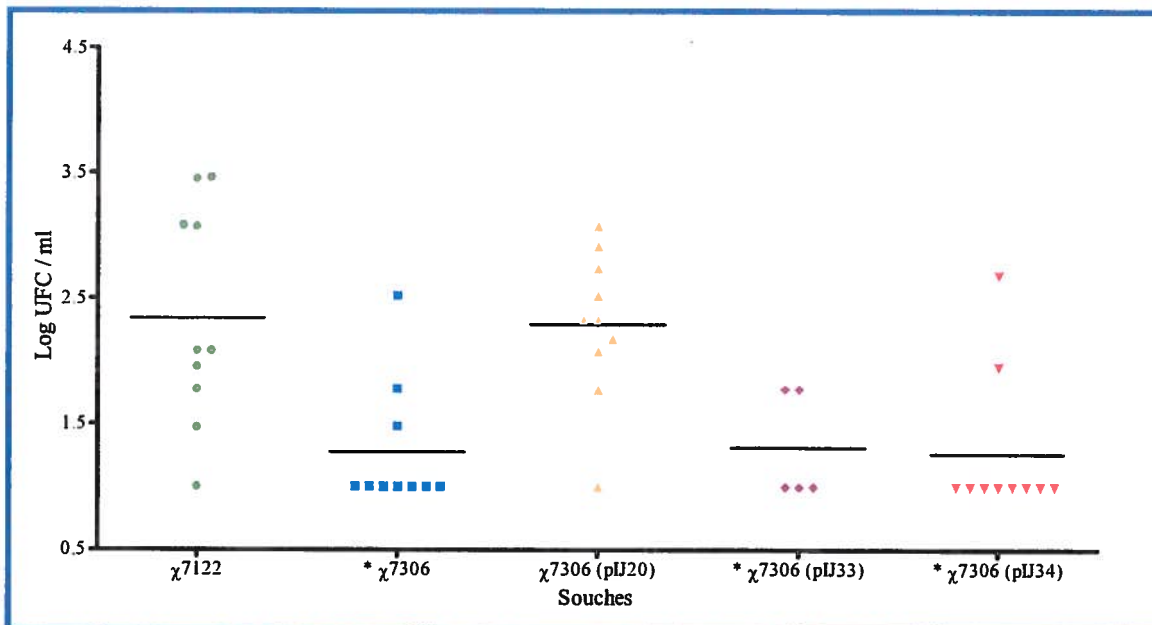


Figure 3.14 : Log UFC / ml de bactéries dans le sang des poulets infectés par les souches $\chi 7122$, $\chi 7306$, $\chi 7306$ (pIJ20) (*iroBCDEN*), $\chi 7306$ (pIJ33) (*iroN*) et $\chi 7306$ (pIJ34) (*iroBCDE*) 6 h après l'infection. Limite de détection 30 UFC. La barre représente la moyenne. * $p < 0,05$ par rapport à la souche $\chi 7122$

Les figures 3.14 à 3.16 montrent que les souches $\chi 7122$ et $\chi 7306$ (pIJ20) (*iroBCDEN*) sont mieux adaptées pour survivre dans le sang des poulets que les souches $\chi 7306$, $\chi 7306$ (pIJ33) (*iroN*) et $\chi 7306$ (pIJ34) (*iroBCDE*). Dès 24 h post-inoculation, ces dernières souches ont été totalement éliminées du sang, tandis que la souche sauvage et la souche $\chi 7306$ (pIJ20) sont encore détectables. Des différences significatives ont été notées pour les souches $\chi 7306$ et $\chi 7036$ (pIJ34) en comparaison avec la souche $\chi 7122$ à 6 h et 24 h post-inoculation. Toutefois, la différence non-significative entre $\chi 7122$ et $\chi 7306$ (pIJ33) à 24 h post-infection est probablement due nombre limité de données pour $\chi 7306$ (pIJ33).

Par la suite, les animaux ont été euthanasiés et une autopsie a été pratiquée sur chacun. Une évaluation des lésions au niveau des sacs aériens, du cœur et du foie a été effectuée. L'échelle d'évaluation s'étend de 0 à 4 où 4 correspond à une atteinte maximale de l'organe. Une note de 0 à 1 est attribuée à un organe pas ou peu atteint. Une note de 2 à 3 est donnée à un organe qui présente des nécroses tissulaires de faible à moyenne intensité. Finalement, une note de 4 est attribuée à un organe présentant des nécroses sévères et de la fibrose.

Tableau 3.2 : Évaluations des lésions au niveau des sacs aériens, du cœur et du foie causées par les souches $\chi 7122$, $\chi 7306$, $\chi 7306$ (pIJ20) (*iroBCDEN*), $\chi 7306$ (pIJ33) (*iroN*) et $\chi 7306$ (pIJ34) (*iroBCDE*). * $p < 0,05$ en comparaison avec la souche $\chi 7122$

Souches	Lésions			
	sacs aériens		Cœur	Foie
	gauche	Droit		
$\chi 7122$	2,5 ± 1,5	1,8 ± 1,0	2,4 ± 1,6	1,4 ± 1,0
$\chi 7306$	0,2 ± 0,4 *	2,1 ± 0,7	0,4 ± 0,2 *	0,0 ± 0,0 *
$\chi 7306$ (pIJ20)	2,6 ± 0,6	0,9 ± 0,6 *	2,4 ± 1,3	1,7 ± 1,1
$\chi 7306$ (pIJ33)	0,1 ± 0,2 *	1,5 ± 1,0	0,4 ± 0,2 *	0,1 ± 0,2 *
$\chi 7306$ (pIJ34)	0,1 ± 0,2 *	1,0 ± 1,1 *	0,5 ± 0,4 *	0,2 ± 0,3 *

Le tableau 3.2 démontre que les lésions les plus sévères ont été causées par les souches $\chi 7122$ et $\chi 7306$ (pIJ20). Les souches $\chi 7306$, $\chi 7306$ (pIJ33) et $\chi 7306$ (pIJ34) ne semblent pas avoir atteint gravement les organes évalués. Toutefois, des lésions comparables $\chi 7122$ au niveau du sac aérien droit ont été notées chez les poulets infectés par les souches $\chi 7306$ et $\chi 7306$ (pIJ33).

Finalement, le prélèvement de poumons, de la rate et du foie a permis la détection des souches capables de coloniser et de se multiplier au niveau de ces organes.

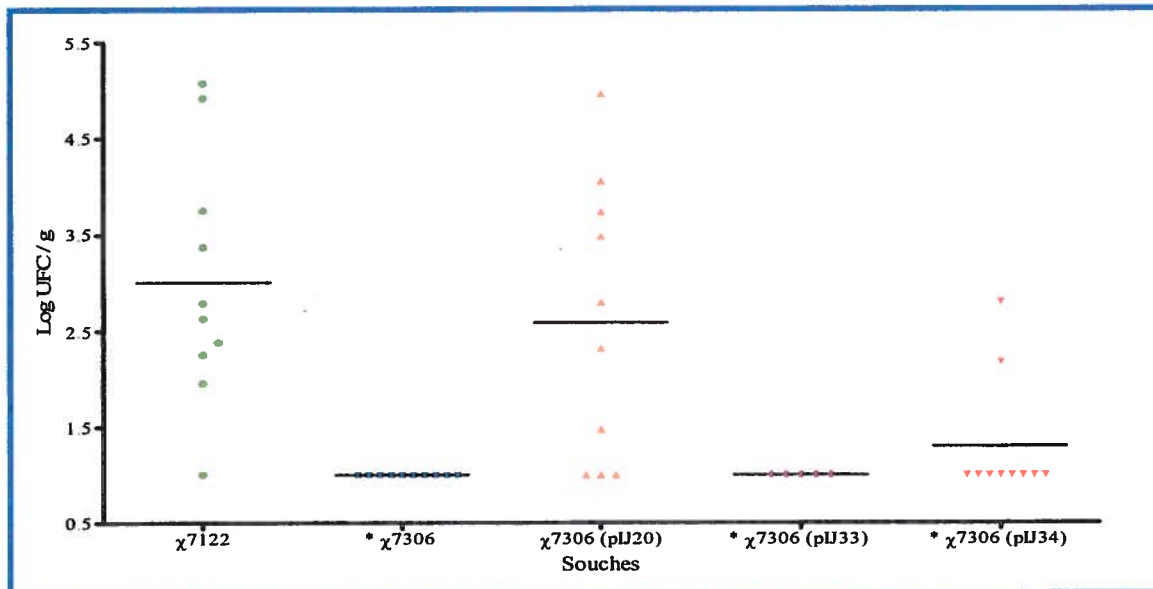


Figure 3.17 : Log UFC / g de bactéries retrouvées dans les poumons des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (*iroBCDEN*), χ 7306 (pIJ33) (*iroN*) et χ 7306 (pIJ34) (*iroBCDE*). Limite de détection 30 UFC. La barre représente la moyenne. * $p < 0,05$ par rapport à la souche χ 7122

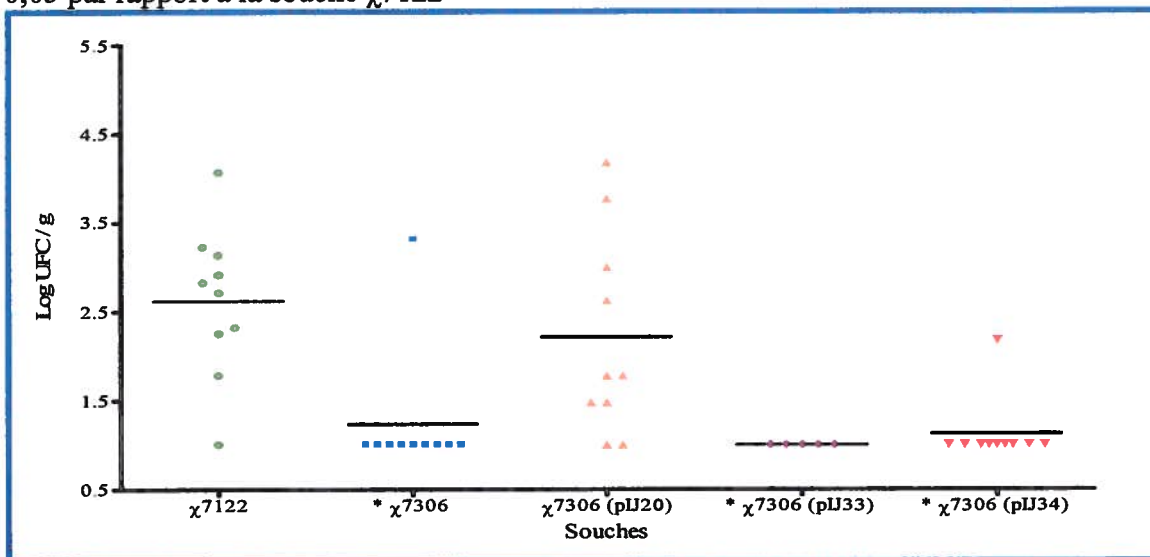


Figure 3.18 : Log UFC / g de bactéries retrouvées dans la rate des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (*iroBCDEN*), χ 7306 (pIJ33) (*iroN*) et χ 7306 (pIJ34) (*iroBCDE*). Limite de détection 30 UFC. La barre représente la moyenne. * $p < 0,05$ par rapport à la souche χ 7122

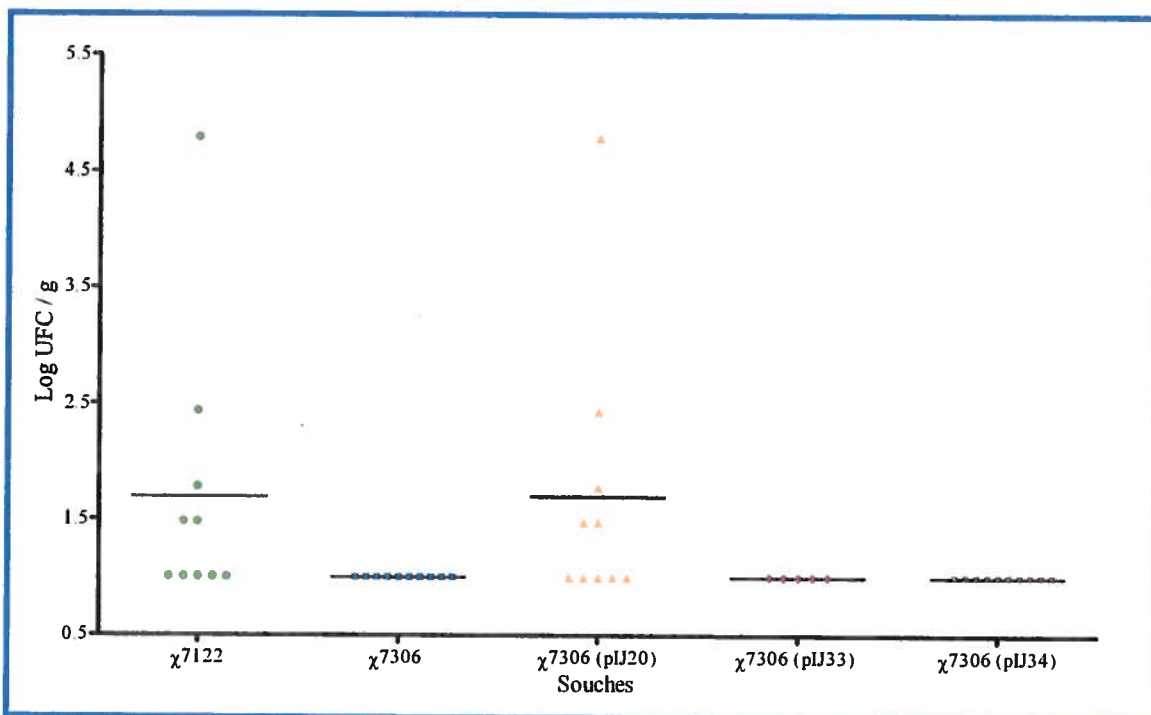


Figure 3.19 : Log UFC / g de bactéries retrouvées dans le foie des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306, χ 7306 (pIJ20) (*iroBCDEN*), χ 7306 (pIJ33) (*iron*) et χ 7306 (pIJ34) (*iroBCDE*). Limite de détection 30 UFC. La barre représente la moyenne. * $p < 0,05$ par rapport à la souche χ 7122

Les figures 3.17 à 3.19 démontrent que les souches χ 7122 et χ 7306 (pIJ20) sont celles qui ont été dénombrées le plus au niveau du poumon, de la rate et du foie. En fait, la souche χ 7306 (pIJ20) présente un phénotype de colonisation similaire à la souche sauvage χ 7122. Les autres souches χ 7306, χ 7306 (pIJ33) et χ 7306 (pIJ34) n'ont pas été détectées en grand nombre dans les organes prélevés. En effet, ces souches ont été incapables de survivre dans le sang, de coloniser les organes et d'y causer des lésions prononcées.

3.4 L'interrelation entre la production des salmochelines et de l'entérobactine

La voie de synthèse des salmochelines est inconnue à ce jour. Cependant, quelques expériences ont démontré une interrelation entre la production de l'entérobactine et les salmochelines. Cela dit, aucune expérience n'a démontré clairement le lien synthétique entre les deux sidérophores. Ainsi, notre groupe de recherche s'est penché sur la question.

Tout d'abord, l'introduction des gènes *iroBCDEN* dans la souche 1017, qui ne produit plus l'entérobactine, n'a pas permis à la souche mutante de bien croître dans un milieu pauvre en fer. La courbe de croissance de cette souche a été établie, ainsi que celles de quelques souches contrôles (figure 3.20).

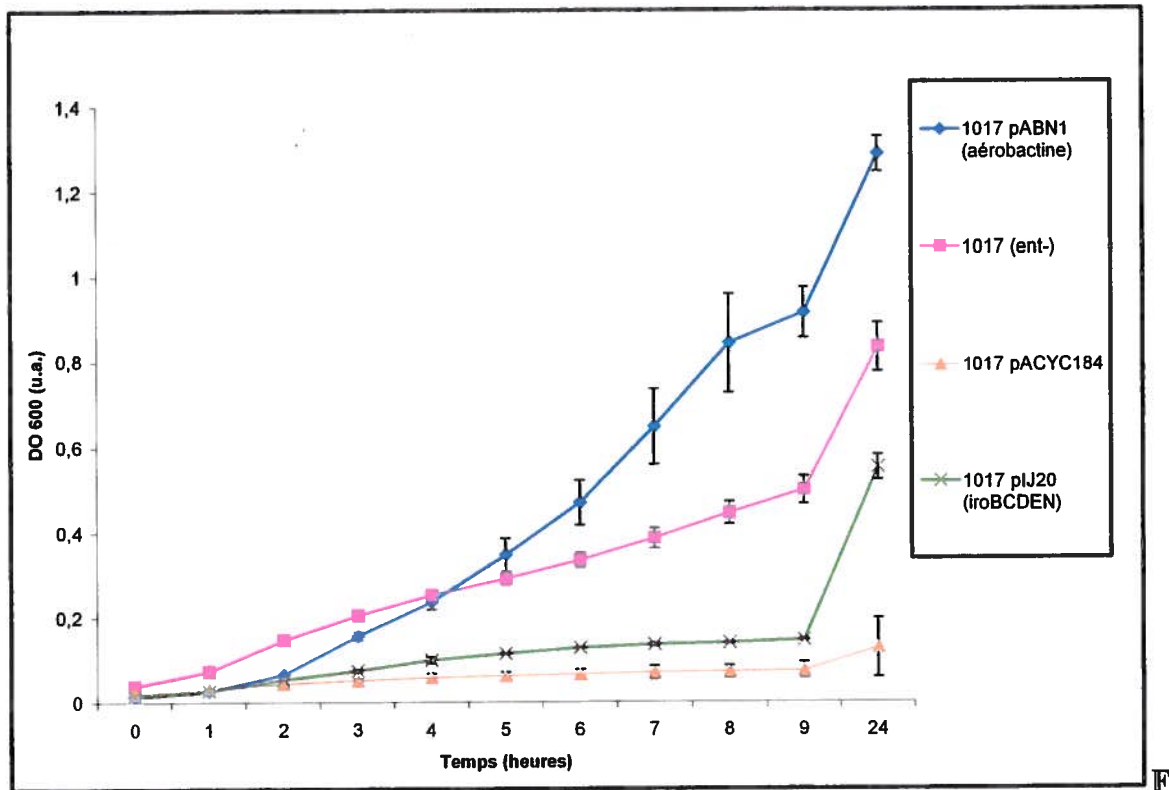


figure 3.20 : Courbe de croissance de 1017 et de ses dérivés dans le milieu NB en présence de 75 μ M de dipyridyl.

Il est à noter, sur la figure 3.20, que la souche 1017 croît relativement mieux que la souche 1017 (pACYC184) et la souche 1017 (pIJ20) (*iroBCDEN*), mais pousse moins bien que la souche 1017 (pABN1) (*iucABCDiutA*) en milieu pauvre en fer.

La souche 1017 et ses dérivées ont été également inoculées sur des milieux CAS (figure 3.21). Les phénotypes observés pour les souches 1017, 1017 (pACYC184) et 1017 (pIJ20) sont une croissance relativement bonne, mais aucune sécrétion de sidérophore. Par contre, la souche 1017 (pABN1) présente une bonne croissance et une sécrétion modérée de sidérophore.

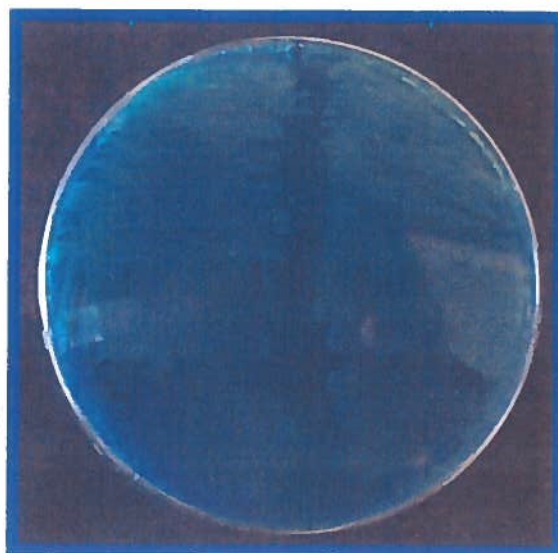


Figure 3.21 : Photo des souches 1017 (pACYC184) (gauche) et 1017 (pIJ20) (droite) sur milieu CAS.

Par ailleurs, l'étude de l'interrelation entre la synthèse de l'entérobactine et les salmochelines s'est poursuivie chez les souches dérivées de χ 7122. En fait, les souches QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-) ont été utilisées pour les expériences d'isolement des salmochelines et de l'entérobactine par colonne anionique de DE52 DEAE-cellulose. Les analyses en CL/SM ont révélé l'absence d'entérobactine et de ses produits de dégradation et l'absence également des salmochelines. De plus, l'entérobactine et ses produits de dégradations ont été purifiés par colonne échangeuse d'ions et ajouté au milieu de croissance de la souche QT163 afin de vérifier si la synthèse des salmochelines se fait à partir de l'entérobactine et de ses produits de dégradations. Toutefois, les quelques essais effectués se sont avérés infructueux, laissant croire que les salmochelines ne sont pas produites par une voie de récupération de l'entérobactine. La synthèse des salmochelines semble se faire plutôt *de novo* et partage les voies métaboliques de l'entérobactine.

La virulence des souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-) a été testée chez le modèle aviaire. Ces infections ont permis d'établir clairement le rôle de chaque sidérophore pour la virulence des souches. Tout d'abord, la présence des souches dans le sang à 6 h, 24 h et 48 h a été étudiée par prélèvement sanguin et dénombrement bactérien.

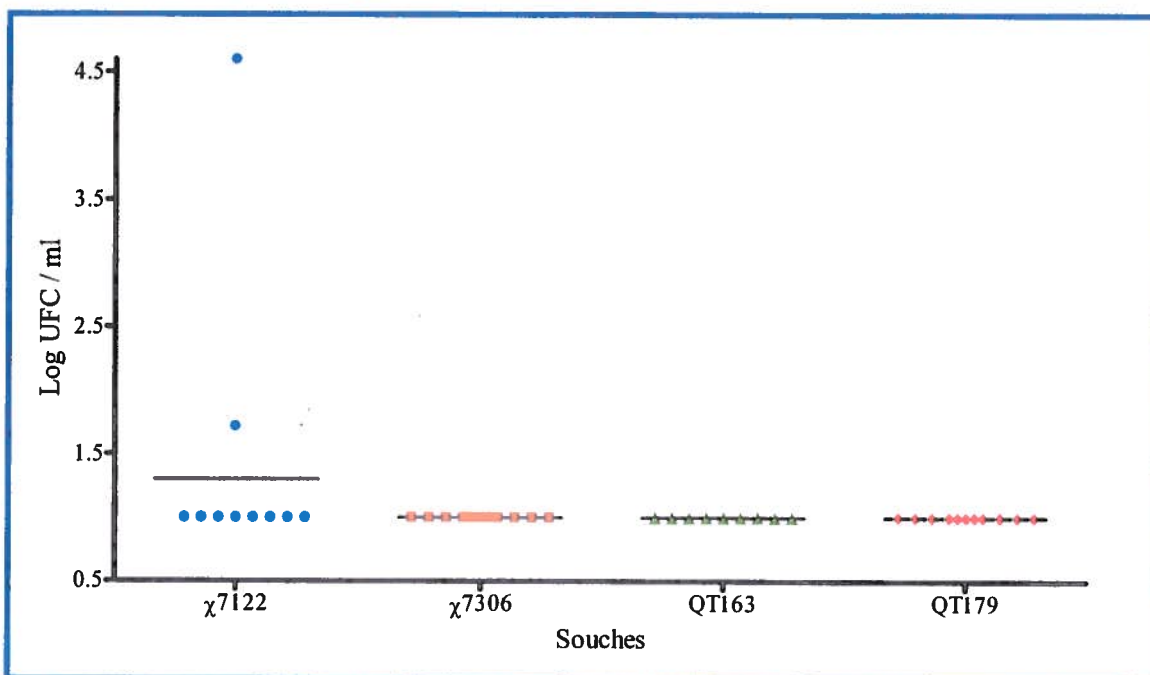


Figure 3.24 : Log UFC / ml de bactéries dans le sang à des poulets infectés par les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-) 48 h après l'infection. Limite de détection 5 UFC. La barre représente la moyenne. * $p < 0,05$ par rapport à la souche χ 7122

Il est à remarquer dans les figures 3.22 à 3.24 que la survie dans le sang est beaucoup plus facile pour la souche sauvage χ 7122 que pour les souches mutantes. Cependant, très peu de bactéries ont été dénombrées dans le sang après 48 h. La souche χ 7306 est complètement inhibée après 24 h. Quant à la souche QT163, elle persiste dans le sang à 24 h, mais n'est pas détectée à 48 h. Finalement, la souche QT179 a été très peu détectée dans le sang après 6 h et elle est totalement absente à 24 et 48 h.

À 48 h post-infections, les animaux ont été euthanasiés et une autopsie a été pratiquée sur chacun. Des lésions au niveau des sacs aériens, du cœur et du foie ont été évaluées sur une échelle de 1 à 4 où 4 correspond à une atteinte maximale de l'organe.

Les figures 3.25 à 3.27 démontrent la présence de bactéries au niveau des organes. Cela signifie que celles-ci ont bien survécu dans le sang et ont été capables d'atteindre et de coloniser les organes. Les bactéries ayant ainsi établi une infection dans les organes sont les souches χ 7122 et QT163. La souche QT163 (Ent-) n'est muté que dans le gène *entD* et empêche la bactérie de produire l'entérobactine. Cependant, la souche χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-) ne possède pas de mutation au niveau du système de l'entérobactine et est toutefois incapable d'établir une infection. Finalement, la souche QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-), qui ne produit aucun sidérophore, est complètement absente des organes.

Chapitre IV

Discussion

4.1 La caractérisation du gène *iroN*

La caractérisation des gènes *iroBCDEN* retrouvés chez la souche *E. coli* pathogène aviaire χ 7122 a tout d'abord débuté par la caractérisation du gène *iroN*. Ce gène découvert en premier lieu chez *Salmonella typhi* et *Salmonella typhimurium* code pour un récepteur de sidérophore de type catécholate. Parmi les sidérophores reconnus et incorporés par Iron, il y a l'entérobactine, le DHBS, la myxocheline A, la corynebactine et les salmochelines (Baumler *et al.*, 1998; Bister *et al.*, 2004; Hantke *et al.*, 2003; Rabsch *et al.*, 1999). Les expériences qui ont permis de conclure ces faits sont soit des expériences d'incorporation du fer radioactif couplé aux différents sidérophores, ou des expériences de croissance bactérienne en présence de sidérophores exogènes ajoutés au milieu de croissance pauvre en fer. Aucun groupe de recherche n'a démontré clairement la courbe de croissance d'une souche de *E. coli* K-12 mutante pour le récepteur de l'entérobactine FepA et complémentée avec le récepteur Iron.

La figure 3.1 montre en effet les courbes de croissance en milieu pauvre en fer de la souche H5058 mutante (FepA-) et celles complémentées avec le vecteur pACYC184, les gènes *iroBCDEN* (pIJ20), le gène *iroN* (pIJ33), le gène *fepA* (pIJ68) et le gène *pfeA* (pCD3). Sur cette figure, il est à noter la faible croissance des souches H5058 et H5058 (pACYC184), et ce, même après 24 h d'incubation. Par contre, les souches H5058 complémentées avec un des trois récepteurs (Iron, FepA et PfeA) possèdent toutes la capacité de bien croître dans le milieu de culture. Cette expérience démontre ainsi que l'entérobactine est reconnue et est internalisée par les trois récepteurs.

De plus, les phénotypes de croissance observés sur milieu CAS appuient aussi cette conclusion. En effet, les souches mutantes H5058 et H5058 (pACYC184) présentent une forte sécrétion d'entérobactine et une faible croissance sur le milieu CAS. Cette forte sécrétion est due à l'expression quasi constitutive des gènes de l'entérobactine, puisque la répression par Fur ne peut s'appliquer sans ion ferreux (Lavrrar et McIntosh, 2003). Par ailleurs, les souches H5058 complémentées avec un des trois récepteurs poussent très bien sur ce milieu et ne sécrètent pas excessivement de sidérophore (figure 3.3).

Enfin, la dernière expérience pour la caractérisation du gène *iroN* fut la sensibilité aux colicines B et Ia (tableau 3.1). Les colicines sont des toxines létales pour les bactéries qui y sont sensibles. Les modes d'actions des colicines sont la reconnaissance et liaison de la colicine à un récepteur de la membrane externe, la translocalisation périplasmique et le déclenchement de la fonction toxique de la colicine (Hilsenbeck *et al.*, 2004). La colicine B agit suite à la reconnaissance de la toxine par le récepteur de l'entérobactine FepA. Cette toxine a la propriété de déstabiliser le potentiel électrochimique de la membrane interne des bactéries suite à la création d'un pore dans cette membrane et la mort cellulaire s'en suit. La colicine Ia agit de façon identique à la colicine B à une exception près, elle est reconnue par le récepteur CirA de la membrane externe (Brickman et Armstrong, 1996; Zakharov et Cramer, 2002). Les tests de sensibilité aux colicines B et Ia avaient pour but de vérifier la spécificité de reconnaissance de chaque récepteur pour les deux toxines. En premier lieu, les souches H5058 mutantes pour les récepteurs FepA et CirA et complémentées avec le vecteur pACYC184, les gènes *iroBCDE* et le récepteur PfaA ne présentent aucune sensibilité pour les colicines B et Ia. La colicine B n'a pas eu d'effet d'ailleurs sur la souche QT744 (BW25113 FepA-, CirA+), or cette souche présente une forte zone d'inhibition de croissance en présence de CirA. En fait, l'absence de récepteur FepA empêche la reconnaissance et l'internalisation de la colicine B et ainsi l'activité toxique de la colicine ne peut être accomplie. Par contre, la souche H5058 complémentée avec le gène *fepA* devient fortement sensible à la colicine B et est également inhibée par la colicine Ia. Cette observation fut aussi notée chez la souche QT746 (BW25113 CirA-). En fait, bien que cette souche n'exprime plus le récepteur CirA, la colicine Ia réussit tout de même à créer une zone d'inhibition de croissance. Cette zone d'inhibition est toutefois inférieure à celle de la souche parente BW25113 possédant le récepteur CirA. Cette colicine est donc reconnue et internalisée par le récepteur FepA de façon moins efficace que CirA, mais empêche tout de même la croissance des souches bactériennes possédant le récepteur FepA. La différence de diamètre entre la souche H5058 pIJ68 (*fepA*), qui est de 12 mm, et la souche QT746 (BW25113 FepA+, CirA-), qui est de 9 mm, est peut-être causée par la forte expression du récepteur FepA chez H5058 (pIJ68) qui se retrouve sur un plasmide à plusieurs copies par cellule. De plus, les diamètres de la zone d'inhibition de H5058 (pIJ68) (*fepA*), BW25113 et de QT746 (BW25113 FepA+, CirA-) causés par la colicine B sont sensiblement les mêmes, soit entre 19 mm et 20 mm. Par ailleurs, les souches H5058

complémentées avec les gènes *iroBCDEN* et *iroN* présentent elles aussi des zones d'inhibitions de croissance lorsqu'elles sont mises en contact avec la colicine B, mais elles sont moins intenses que la souche H5058 complémentée avec le gène *fepA*. Néanmoins, ces souches complémentées avec le récepteur *IroN* sont résistantes à la colicine Ia. En bref, les récepteurs *FepA*, *IroN* et *PfeA* ont tous la capacité d'incorporer l'entérobactine, mais arborent des différences significatives pour la liaison aux colicines B et Ia.

Les analyses bioinformatiques des séquences protéiques des récepteurs *IroN*, *FepA*, *PfeA*, *CirA*, *PirA* et *BfeA* ont révélé que bien que ces récepteurs possèdent une fonction similaire, ils présentent tout de même des différences dans leurs séquences protéiques (figure 3.4). Ces différences sont probablement à l'origine de leur spécificité d'incorporation. Ceci pourrait expliquer néanmoins les différences d'incorporations des colicines. Il est à noter toutefois que le « plug domain » est la région la mieux conservée. Ce domaine possède en fait une fonction primordiale, soit la translocation des molécules, lequel est un mécanisme utilisé par tous les récepteurs.

Par ailleurs, à l'aide des analyses bioinformatiques, trois boîtes Fur ont été retrouvées dans les promoteurs des gènes *iroN* et *iroB* de la séquence *iro* de la souche χ 7122 (figure 3.5). En fait, la boîte Fur putative de *iroN* se situe à 112 pb avant le codon de départ du gène *iroN* et ne diffère que de trois nucléotides par rapport à la séquence consensus déterminée par de Lorenzo (de Lorenzo *et al.*, 1987). La séquence nucléotidique de *iroB* contient deux boîtes Fur possibles. En fait, la première boîte retrouvée à 486 pb avant le début du gène, est identique à la séquence de la boîte Fur de *S. typhi* identifiée par Bäumlér et ses collaborateurs. Or, cette boîte Fur a été retrouvée à seulement 70 pb avant le début du gène (Baumlér *et al.*, 1996). Néanmoins, une deuxième boîte Fur putative, qui ne diffère que de neuf nucléotides par rapport à la séquence consensus, a été découverte à seulement 207 pb avant le codon de départ du gène *iroB*. Bien que cette boîte Fur présente des différences nucléotidiques en comparaison avec la séquence consensus, sa position est toutefois dans la région du promoteur, contrairement à la boîte Fur situé à 486 pb en amont du début du gène *iroB*. Généralement, les boîtes Fur se retrouvent dans les régions des promoteurs entre les sites -35 et -10. Ces analyses démontrent en fait que les gènes *iroBCDEN* de la souche

APEC χ 7122 sont probablement régulés par Fur, tout comme Baümler et ses collaborateurs l'ont démontrés avec la séquence *iro* de *S. typhi* (Baumler *et al.*, 1996).

4.2 La caractérisation des gènes *iroD* et *iroE*

Par la suite, la caractérisation du système *iro* a continué avec l'étude des gènes *iroD* et *iroE*. Ces deux gènes ont été très peu étudiés, toutefois leurs séquences protéiques indiquent qu'ils codent pour des estérases putatives différentes. En fait, IroD est homologue à l'estérase Fes de l'entérobactine et se situe au niveau du cytoplasme bactérien. IroD possède aussi des homologues, soit les gènes MceD, McmK et MchS1, qui sont probablement impliqués dans la synthèse et la maturation des microcines E492 et H47 et des colicines G et H (figure 3.6) (Azpiroz et Lavina, 2004; Patzer *et al.*, 2003). Quant à IroE, il a été caractérisé comme une hydrolase périplasmique, puisqu'il possède un peptide signal (Hantke *et al.*, 2003). De plus, les comparaisons des séquences protéiques de IroD et de IroE ont révélé que ces protéines font partie de la famille des estérases putatives. Ainsi, les séquences de ces deux gènes laissent suggérer qu'ils sont probablement impliqués dans la dégradation des sidérophores, soit l'entérobactine et/ou les salmochelines. La dégradation des salmochelines n'est pas bien définie à ce jour, bien qu'une étude de Bister *et al.* a mentionné qu'en absence de *iroD* et *iroE*, il y a augmentation de la salmocheline S4 et diminution des salmochelines S1 et S2 comparativement aux niveaux de salmochelines détectées en leur présence (Bister *et al.*, 2004). D'autres recherches sont nécessaires afin d'approfondir ce point.

Par ailleurs, la dégradation de l'entérobactine a été vérifiée à l'aide d'expérience de croissance en milieu pauvre en fer de la souche AN272 (Fes-) qui ne possède pas la capacité de dégrader le complexe ferri-entérobactine et l'entérobactine (figure 3.7). Les souches AN272 et AN272 (pACYC184) sont en effet incapables de bien croître dans un milieu pauvre en fer. En fait, la mutation au niveau du gène *fes* empêche la dégradation du complexe ferri-entérobactine et l'utilisation subséquente du fer dans ses divers processus biologiques (Winkelmann *et al.*, 1994). C'est pourquoi la croissance de la souche AN272 est grandement affectée par cette mutation. Cependant, cette inhibition de croissance est

levée lorsque la souche AN272 est complémentée avec les gènes *fes*, *iroD* et/ou *iroE*. Il est à noter que la courbe de croissance de la souche complémentée avec le gène *iroD* est très similaire à la courbe de croissance de la souche complémentée avec le gène *fes*. Par contre, la courbe de croissance de la souche complémentation par le gène *iroE* est toutefois plus lente que celles des souches complémentées avec *fes* ou *iroD*. Cette moindre efficacité enzymatique est peut-être attribuable à la localisation périplasmique de l'enzyme. Par contre, après 24 h d'incubation, aucune différence de croissance n'est notable. Ainsi, les trois enzymes, Fes, IroD et IroE, possèdent toutes la capacité de dégrader le complexe ferri-entérobactine.

Il a été observé que les souches AN272, AN272 (pACYC184) ont de la difficulté à bien croître sur le milieu CAS, en plus de sécréter fortement l'entérobactine (figure 3.8). En fait, le manque de fer empêche la répression de la production du sidérophore par Fur. Ainsi, le système de production et sécrétion de l'entérobactine est toujours exprimé (Lavrrar et McIntosh, 2003). Par contre, les souches AN272 complémentées avec les gènes *fes* et *iroD* poussent bien sur le milieu CAS et sécrètent modérément le sidérophore (figure 3.8). Ceci indique que le complexe ferri-entérobactine est dégradé par les enzymes Fes et IroD et qu'il y a eu répression par Fur lorsque le niveau interne de fer a atteint l'homéostasie. Par ailleurs, la souche AN272 complémentée avec le gène *iroE* présente quelques difficultés à bien croître sur le milieu CAS et sécrète énormément de sidérophore. Ces phénotypes corroborent bien avec la courbe de croissance de cette souche où une lenteur de croissance était notable. Ainsi, IroE peut dégrader le complexe ferri-entérobactine, mais il semblerait que l'activité de cette enzyme ne soit pas aussi élevée que celle de IroD ou de Fes pour assurer une bonne croissance de la bactérie en milieu pauvre en fer. Cette différence d'activité enzymatique n'est pas attribuable à la régulation par Fur, puisque les deux clones, pIJ52 (*iroD*) et pIJ54 (*iroE*), possèdent le même promoteur. De plus, la souche AN272 complémentée avec les gènes *iroDE* croît plus difficilement sur le milieu CAS que la souche possédant seulement le gène *iroD*, même si la sécrétion d'entérobactine est similaire pour les deux souches. Cette différence de croissance peut être attribuable à la présence du gène *iroE* dans la première souche qui gêne peut-être le bon fonctionnement de l'utilisation de l'entérobactine. En fait, la séquence protéique et la localisation périplasmique de cette enzyme laissent supposer, à première vue, que sa

fonction n'est peut-être pas la dégradation de l'entérobactine, bien qu'elle en soit capable, et ce, à une efficacité moindre que IroD et Fes. La véritable fonction de cette protéine est peut-être la dégradation des salmochelines, ce reste encore à démontrer.

Une dernière expérience a été effectuée afin d'éclaircir les résultats précédents, soit la dégradation de l'entérobactine par les gènes *iroD* et *iroE*. Pour ce faire, des extractions à l'acétate d'éthyle des surnageants de cultures des souches AN272 et ses dérivées cultivées en milieu pauvre en fer ont eu lieu. Les extractions à l'acétate d'éthyle avaient pour but d'aller chercher l'entérobactine et ses produits de dégradations présents dans le surnageant et de les concentrer par la suite pour mieux les détecter en CL/SM (figure 3.9).

Les résultats obtenus démontrent que les quantités de monomère et de dimère de DHBS sont significativement plus élevées chez les souches AN272 complémentées avec les gènes *fes*, *iroD* et/ou *iroE* comparativement aux niveaux détectés chez les souches AN272 et AN272 (pACYC184) (figure 3.10). Ceci indique que les trois enzymes sont capables de dégrader le complexe ferri-entérobactine. De plus, les quantités d'entérobactine sécrétées par les souches AN272 et AN272 (pACYC184) sont significativement plus élevées que chez les souches complémentées avec une des trois estérases. Cette dernière observation s'explique par le fait que les souches mutées dans le gène codant pour l'estérase Fes ne peuvent tout simplement pas dégrader les complexes ferri-entérobactines et ultimement utiliser le fer. Ainsi, la répression par Fur n'a pas lieu et la production et la sécrétion de l'entérobactine est constante. De plus, l'incapacité à dégrader le sidérophore ferrique empêche l'utilisation du fer dans les divers processus biologiques de la bactérie et compromet sérieusement la croissance de celle-ci. Les courbes de croissances et les phénotypes CAS de ces bactéries mutantes confirment ainsi ces derniers résultats.

Par ailleurs, la quantité de trimère détectée semble être plus élevée chez les souches AN272 possédant les gènes *fes* ou *iroE* en comparaison avec les souches mutantes et celles complémentées avec les gènes *iroD* ou *iroDE*. Dans le cas des souches mutantes, il est normal que la quantité de trimère soit effectivement très basse, puisque ces souches ne possèdent pas d'estérase pouvant dégrader l'entérobactine en trimère de DHBS. Cependant, IroD semble être plus efficace que IroE et Fes pour dégrader le trimère en

dimère et monomère de DHBS. Toutefois, les quantités de dimère et monomère de DHBS sont similaires entre les souches complémentées avec IroD et Fes. De plus, les profils quantitatifs de chaque produit de dégradation de l'entérobactine sont similaires entre les souches AN272 complémentées avec les gènes *iroDE* ou *iroD*. Ceci suggère que IroE ne participe pas dans la dégradation. Toutefois, il a été démontré précédemment que IroE possédait une activité de dégradation moins efficace que celle de IroD. Ainsi, en présence de IroD, l'activité enzymatique de IroE est moins facilement décelable, puisque IroD semble faire tout le travail. Ceci expliquerait la similitude des profils de dégradations entre les deux souches. Or, la souche possédant le gène *iroE* présente un niveau assez élevé de monomère et de dimère comparativement aux souches complémentées avec IroD et Fes. Ces quantités élevées de monomères et de dimères sont peut-être attribuables à la moindre efficacité initiale de l'enzyme. En d'autres mots, en début de culture, il a été noté que la croissance de la souche AN272 complémentée avec le gène *iroE* est affectée dans le milieu pauvre en fer, or après 24 h d'incubation, ce retard de croissance disparaît. Ainsi, à cause du stress ferrique subi par la bactérie et à la moindre efficacité de l'enzyme IroE, une hypersécrétion d'entérobactine peut avoir eu lieu pendant la phase exponentielle de la culture. En fait, ceci corrobore les résultats déduits des phénotypes observés sur le milieu CAS. Par contre, après 24 h de culture, l'enzyme a probablement été capable de couper les liens esters de quelques molécules d'entérobactine, libérant ainsi le fer et activant du même coup la répression par Fur. C'est pourquoi, de grandes quantités de monomère et de dimère ont été détectées dans le surnageant de cette souche. Or, il serait intéressant de vérifier l'activité enzymatique de chaque estérase en fonction du temps d'incubation des cultures.

4.3 La production des salmochelines

L'étude des gènes *iroBCDEN* s'est continuée avec la détermination des gènes responsables de la synthèse et de la sécrétion des salmochelines. Tout d'abord, des plasmides contenant un ou plusieurs gènes *iro* ont été construits et introduits dans la souche χ 7306 mutante pour l'agglutinine thermosensible, l'aérobactine et le système Iro (Tsh-, Aéro- et Iro-). La souche χ 7301 (Tsh- et Aéro-) a été choisie à titre de référence au lieu de χ 7122, et ce, afin d'éviter la production d'aérobactine et de forcer la production des salmochelines. Ensuite,

les différentes souches ont été cultivées dans un milieu pauvre en fer afin de forcer la production de sidérophore. L'isolement et la détection des salmochelines, de l'entérobactine et de ses produits de dégradation ont permis de mieux comprendre le rôle des gènes dans ce système complexe (figure 3.11).

En premier lieu, la détection de salmochelines a été possible chez toutes les souches mutantes à l'exception des souches $\chi7306$ et $\chi7306$ (pIJ33) (*iroN*) (figure 3.12). La souche $\chi7306$ est en fait dépourvue des gènes *iro*, c'est pourquoi aucune salmocheline n'est détectable. De plus, l'ajout du gène *iroN* n'a pas contribué à la production des sidérophores. Les salmochelines SX, S1 et S5 ont été isolées chez les souches $\chi7301$, $\chi7306$ (pIJ20) (*iroBCDEN*), $\chi7306$ (pIJ34) (*iroBCDE*), $\chi7306$ (pIJ37) (*iroBDEN*) et $\chi7306$ (pIJ38) (*iroBDE*) (figure 3.12). Par contre la salmocheline S4, qui est la molécule clé des salmochelines, est absente dans tous les échantillons. En fait, S4 n'a jamais été isolée lors de ces expériences. Cette absence peut s'expliquer par plusieurs différences entre les méthodes d'isolement et de détection que nous avons utilisées et celles utilisées par le groupe de Bister (Bister *et al.*, 2004). Tout d'abord, l'isolement des sidérophores a été effectué à partir de souches de *E. coli* et non à partir de la souche *Salmonella enterica* H5547 utilisée par le groupe de Bister (Bister *et al.*, 2004). La différence de souche utilisée pourrait être en cause. Aussi, nous n'avons pas utilisé la souche pathogène aviaire $\chi7122$, mais bien une souche dérivée de celle-ci. Toutefois, il serait surprenant que ce choix de souche soit la cause de l'absence de détection de S4, puisque les gènes mutés dans la souche $\chi7301$ n'affectent pas la production de l'entérobactine et des salmochelines SX, S1 et S5. Ainsi, il est fort probable que l'analyse du surnageant de $\chi7122$ pour la présence des salmochelines et de l'entérobactine soit sensiblement identique à $\chi7301$ (Tsh- et Aéro-). De plus, la souche *S. enterica* H5547 est d'ailleurs mutée dans le gène *iroC* et probablement dans les gènes *iroD* et *iroE* causée par l'effet polaire de la mutation. Ainsi, l'absence des estérases empêcherait peut-être la dégradation de S4 en S5, S2, S1 et SX, si évidemment ces salmochelines sont des produits de dégradations de S4. Finalement, la quantité de surnageant de culture qui a servi à l'isolement de la salmocheline S4 par le groupe de Bister est 100 fois plus grande que celle utilisée dans nos expériences. Il est possible que cette quantité de surnageant ait été trop petite pour concentrer suffisamment de S4 et ainsi sa détection en spectrométrie de masse fut impossible. Néanmoins, cette

salmocheline serait peut-être plus facilement isolée chez une souche de *E.coli* K-12 possédant les gènes *iroBC* seulement.

À ce jour, nul ne sait si SX, S1, S2 et S5 sont eux-même des sidérophores, des précurseurs ou des produits de dégradation de S4. Néanmoins, il a été rapporté que la mutation des gènes *iroD* et *iroE* augmente les quantités de salmocheline S4 et que leur présence hausse les quantités de S1 et S2 détectées. Bister et ses collaborateurs ont proposé que S1 et S2 soient des produits de dégradation de S4 (Bister *et al.*, 2004). Ceci dit, les substrats de ces estérases pourraient être autant la salmocheline S4 non sécrétée que le complexe ferri-S4, d'autant plus que ceci s'applique pour l'estérase Fes et l'entérobactine (Greenwood et Luke, 1978; Langman *et al.*, 1972). De plus, les salmochelines S1 et S2 possèdent des propriétés de chélation du fer, puisque des essais de croissance bactérienne en milieu pauvre en fer ont été réussis suite à l'ajout de ces salmochelines (Hantke *et al.*, 2003). S1 et S2 sont donc des sidérophores. Ainsi, il serait intéressant d'approfondir les recherches sur la biosynthèse des salmochelines et de leur dégradation.

Par ailleurs, seul le surnageant de la souche χ 7306 (pIJ34) (*iroBCDE*) contient la salmocheline S2. L'absence du récepteur IroN semble en être responsable, puisque aucune trace de S2 n'a été détectée dans l'échantillon de χ 7306 (pIJ20) (*iroBCDEN*) (figure 3.12). En fait, le manque de récepteur empêche l'internalisation de la salmocheline S2 et peut-être sa dégradation. Quoiqu'il en soit, la mutation de *iroN* aide certainement à l'isolement de S2. Il est cependant curieux de retrouver les salmochelines SX, S1, S2 et S5 dans cette culture dans l'optique où S4 est le sidérophore clé et que ces salmochelines sont le résultats de la dégradation de S4. En d'autres mots, il est difficile d'expliquer la présence des produits de dégradation de S4 supposés, dans une culture d'une bactérie qui ne possède pas de récepteur pour internaliser S4 et subséquemment la dégrader. Toutefois, la salmocheline S4 est peut-être facilement dégradée par le manque de stabilité ou par la présence d'estérases relâchées dans le milieu suite à la lyse naturelle des cellules bactériennes après 18 h d'incubation. Or, la détection de S4 aurait assurément aidé à l'élucidation de cette observation.

Néanmoins, les salmochelines SX, S1 et S5 ont été isolées chez les souches $\chi 7301$, $\chi 7306$ (pIJ20) (*iroBCDEN*), $\chi 7306$ (pIJ34) (*iroBCDE*), $\chi 7306$ (pIJ37) (*iroBDEN*) et $\chi 7306$ (pIJ38) (*iroBDE*) (figure 3.12). Les mutations des gènes *iroN* et *iroC* ne semblent pas affecter la production des salmochelines. En fait, la production des salmochelines est attribuable à la présence du gène *iroB* sur chacun des plasmides à l'étude. En effet, dans l'article de Bister, publié récemment, ces derniers octroient à IroB l'entière responsabilité de la synthèse des salmochelines. Toutefois, ils mentionnent que IroC est probablement nécessaire à l'exportation de la salmocheline S4 (Bister *et al.*, 2004). La mutation de la pompe exportatrice IroC chez les souches $\chi 7306$ (pIJ37) et $\chi 7306$ (pIJ38) n'a toutefois pas affecté la sécrétion de SX, S1 et S5. Or, le faible poids moléculaire de SX (403 Da) lui permet la diffusion passive à travers les membranes bactériennes. Quant à S1 et S5, leurs hauts poids moléculaires, 626 Da et 788 Da respectivement, les obligent à utiliser une pompe exportatrice. Bien que IroC soit mutée, EntS, protéine exportatrice de l'entérobactine, est toujours fonctionnelle au sein de ces souches (Furrer *et al.*, 2002). Il serait possible que ces molécules utilisent la pompe EntS pour se retrouver dans le surnageant de culture.

Finalement, la différence entre les quantités de salmochelines retrouvées dans chaque culture est difficilement explicable. Néanmoins, S1 est beaucoup plus produite chez la souche $\chi 7301$ qui possède une seule copie des gènes *iroBCDEN* sur le plasmide de virulence pAPEC-1. Le fait d'ajouter un plasmide à plusieurs copies dans les souches pourrait peut-être influencer la régulation de la synthèse et causer une différence dans la production.

L'isolement des salmochelines chez les souches mutantes complémentées avec les plasmides portant différentes combinaisons de gènes *iro* a donné lieu à celle de l'entérobactine. En effet, l'entérobactine et ses produits de dégradation ont été concentrés sur la colonne échangeuse d'ion, ce qui a permis leurs détections en CL/SM. L'entérobactine et/ou ses produits de dégradations ont été retrouvés chez toutes les souches analysées (figure 3.13). Toutefois, les quantités retrouvées de ces diverses molécules diffèrent entre les souches. Il est à noter la très grande quantité d'entérobactine détectée dans le surnageant de culture de la souche $\chi 7306$ (pIJ33) (*iroN*). Cette sécrétion abondante d'entérobactine peut être due à un effet régulateur. Autrement dit, l'introduction du

plasmide possédant seulement le gène *iroN* et son promoteur dans la souche χ 7306 a augmenté le nombre de promoteur et le nombre de boîte Fur au sein de la souche. Ainsi, une plus grande quantité de boîte Fur à réprimer par le complexe Fe^{2+} -Fur a eu pour conséquence une répression tardive des gènes de synthèse et d'utilisation de l'entérobactine. Ainsi, il y a eu une hausse de la production et de la sécrétion du sidérophore. De plus, l'absence des salmochelines n'a fait que retarder la répression, puisque seul l'entérobactine approvisionnait la cellule en fer. En outre, des expériences de RT-PCR pourraient vérifier cette hypothèse.

Par ailleurs, le profil de détection de l'entérobactine et des produits linéaires des souches χ 7301, χ 7306 (pIJ20), χ 7306 (pIJ34), χ 7306 (pIJ37) et χ 7306 (pIJ38) sont similaires, démontrant ainsi que l'absence de *iroN* et/ou *iroC* affecte peu la synthèse, sécrétion et dégradation de l'entérobactine. Finalement, il est à noter la similarité des profils des souches χ 7306 et χ 7306 (pIJ33) qui ne produisent pas de salmochelines, mais génèrent beaucoup de dimère, trimère et d'entérobactine. Deux hypothèses peuvent expliquer la faible quantité de ces produits détectés chez les souches produisant des salmochelines. Tout d'abord, ces souches possédant le gène *iroB* utilisent peut-être directement l'entérobactine, le trimère et le dimère linéaires pour les transformer en salmochelines ou bien elles utilisent l'entérobactine pour produire les salmochelines et que la dégradation des salmochelines génère des produits linéaires différents de ceux de l'entérobactine. Quoiqu'il en soit, il existe certainement une relation biochimique entre la synthèse de ces deux sidérophores.

L'importance du système *iro* pour la virulence de la souche χ 7122 chez le modèle aviaire a été préalablement démontrée (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). Cependant, nul ne sait si la présence de tous les gènes *iro* ou seulement quelques gènes spécifiques sont nécessaires pour l'établissement de l'infection. En fait, dans une étude de Russo et ses collaborateurs, il a été démontré que l'expression de *iroN* de *E. coli* CP9 (UPEC) augmentait de 27,2 fois en présence d'urine humaine, de 65,8 fois dans le sang humain et de 207,2 fois dans le fluide péritonéale humain, en plus d'être réprimé en présence d'une source exogène de fer (Russo *et al.*, 1999). De plus, dans une étude ultérieure, ils ont démontré qu'une mutation du récepteur dans la souche CP9 diminuait significativement la détection de la souche dans

la vessie, les reins et l'urine dans le modèle d'infection du tractus urinaire ascendant chez la souris lors d'infection en compétition avec la souche sauvage. Ce groupe de recherche a conclu que *iroN* représentait un facteur de virulence important pour la souche CP9 (Russo *et al.*, 2002). Suite à cette conclusion, il a été possible de vérifier cette affirmation chez le modèle d'infection aviaire avec la souche χ 7122. En effet, des infections de poulets ont eu lieu en utilisant les souches χ 7122, χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-), χ 7306 (pIJ20) (*iroBCDEN*), χ 7306 (pIJ33) (*iroN*) et χ 7306 (pIJ34) (*iroBCDE*).

L'inoculation des souches dans le sac aérien a permis aux bactéries d'entrer dans la circulation sanguine, puisque cette région d'échange gazeux est relativement vulnérable à la colonisation et à l'invasion bactérienne. De cette façon, la présence de bactéries dans le sang indique que les souches sont capables de résister au complément du sérum et suggère une capacité à coloniser subséquentement les organes des animaux. La colonisation des organes par les bactéries occasionne des lésions macroscopiques tels que des exsudats fibreux et des tissus nécrosés aux niveaux des sacs aériens, des poumons, du péricarde, de la rate et du foie (Pourbakhsh *et al.*, 1997a). Des prélèvements sanguins à 6 h, 24 h et 48 h et ainsi que des biopsies des poumons, de la rate et du foie ont été exécutés dans le but de détecter et de dénombrer les bactéries capables d'établir une infection au sein des animaux.

En premier lieu, les cinétiques de survie dans le sang, l'évaluation des lésions des organes et leurs colonisations démontrent que seules les souches χ 7122 et χ 7306 (pIJ20) (*iroBCDEN*) sont bien adaptées pour établir une infection chez les poulets (figure 3.14 à 3.19 et tableau 3.2). En fait, ce sont les seules souches qui ont persisté dans le sang jusqu'à 24 h post-inoculation et qui ont causé des lésions sévères aux niveaux des sacs aériens, de cœur et du foie en plus d'avoir colonisé les poumons, la rate et le foie. La souche χ 7122 est la souche sauvage non-mutée et elle a servi de contrôle à l'expérience. La souche χ 7306 possède des mutations aux niveaux des gènes *tsh*, *iucABCD*, *iutA* et *iroBCDEN*; elle n'a donc plus la capacité de synthétiser l'aérobactine, les salmochelines et l'hémagglutinine Tsh qui contribue à la formation de lésions au niveau des sacs aériens (Dozois *et al.*, 2000). Tsh n'est toutefois pas le seul facteur de virulence responsable de la formation de lésion au niveau des sacs aériens, d'autres facteurs peuvent aussi en être la cause. Or, les mutations de la souche χ 7306 affectent gravement la virulence de la souche, puisqu'elle est incapable

de survivre dans le sang, de coloniser et de causer des lésions macroscopiques aux organes des animaux. Les seules lésions qu'elle a causées furent au niveau du sac aérien droit, région de l'inoculation. Bien que cette région fut atteinte, cette souche ne s'est montrée nullement capable de coloniser d'autres organes. Ces lésions ont été probablement causées par la réponse immunitaire de l'hôte qui aurait tenté de se débarrasser de cet envahisseur. Toutefois, l'introduction des gènes *iroBCDEN* dans cette souche lui redonne ses capacités virulentes. De plus, la virulence de la souche $\chi 7603$ (pIJ20) (*iroBCDEN*) est aussi intense que la souche sauvage. Ces résultats démontrent bien l'importance des gènes *iroBCDEN* pour la virulence de la souche à l'étude. Par ailleurs, les infections avec les souches $\chi 7306$ (pIJ33) (*iron*) et $\chi 7306$ (pIJ34) (*iroBCDE*) ont révélé que les gènes *iroBCDE* et *iron* séparés sont inefficaces pour rétablir la virulence de la souche et ainsi permettre sa survie dans le sang, la production de lésions macroscopiques et la colonisation des organes chez les poulets. Encore une fois, le seul organe atteint par la souche $\chi 7306$ (pIJ33) fut le sac aérien droit, lieu de l'inoculation. Les différences d'intensité de lésions de cet organe varient d'une souche à l'autre et parfois de façon indépendante de la virulence de la souche, puisque c'est le site d'inoculation bactérienne. C'est pourquoi la colonisation de cet organe n'est pas le seul paramètre à l'étude et que le passage dans le sang et la colonisation d'autres organes sont vérifiés. Néanmoins, ces lésions seraient vraisemblablement causées par la réponse immunitaire de l'hôte. Or, selon les résultats obtenus, *IroN* ne représente pas un facteur de virulence indépendant de l'expression des gènes de synthèse des salmochelines. *IroN* est en fait nécessaire pour permettre l'entrée des salmochelines, qui sont synthétisées et utilisées par les gènes *iroBCDE*. Néanmoins, l'absence de récepteur empêche la souche $\chi 7306$ pIJ34 (*iroBCDE*) d'utiliser les salmochelines, ce qui empêche la survie de la bactérie lors des infections. De plus, la présence du récepteur *FepA* chez toutes les souches pathogènes mutées ou sauvages ne remplace pas l'absence du récepteur *IroN*. *FepA* ne peut donc pas incorporer efficacement les salmochelines lors d'une infection dans le modèle aviaire. Ces données appuient celles des expériences d'incorporation des salmochelines couplées au fer radioactif qui ont démontré que le récepteur *FepA* n'incorpore pas les salmochelines (Hantke *et al.*, 2003). En somme, *IroN* seul ne confère pas à la bactérie mutante des propriétés virulentes essentielles à l'infection. La production et l'incorporation des salmochelines sont essentielles pour la survie et la prolifération des souches lors des infections chez les poulets.

4.4 L'interrelation entre la synthèse de l'entérobactine et des salmochelines

L'interrelation entre la synthèse de l'entérobactine et les salmochelines est le dernier sujet traité au cours de cette étude. En fait, tout a commencé avec la courbe de croissance des souches 1017 et ses dérivées (figure 3.20). La souche 1017 possède une mutation dans un des gènes *ent* et qui abolit ainsi la production de l'entérobactine. Cette mutation empêche donc la souche de subvenir à ses besoins nutritionnels lorsqu'elle est exposée à un milieu pauvre en fer. Les courbes de croissance des souches 1017 et 1017 (pACYC184) ont démontré leur faible capacité à bien pousser dans un milieu où le fer a été séquestré par un chélateur. Cependant, 1017 semble mieux croître dans ce milieu que 1017 (pACYC184). Ceci est probablement causé par la pression de sélection de l'ajout de l'antibiotique chloramphénicol, afin de garder le vecteur plasmidique dans la souche. Cette pression a peut-être ralenti la croissance de la souche. Cette expérience a également mis en lumière l'incapacité des gènes *iroBCDEN* à compléter l'abolissement de la production de l'entérobactine chez la souche 1017. En fait, l'introduction des gènes *iro* dans cette souche n'aide pas à sa croissance. L'absence de production de salmochelines est une explication plausible à cette observation. De plus, la grande ressemblance structurelle entre les deux sidérophores laisse suggérer que leurs voies de synthèses soient communes, du moins pour les premières étapes (figure 1.10). En outre, parmi les gènes *iro*, seul le gène *iroB* s'apparente à un gène de synthèse de sidérophore et rien ne porte à croire qu'il serait responsable de la production complète des salmochelines. Il serait donc très plausible que la voie de synthèse des salmochelines serait intimement reliée à la voie de synthèse de l'entérobactine. Ainsi, une mutation au niveau d'un gène de synthèse de l'entérobactine affecterait également la synthèse des salmochelines. Ceci expliquerait l'incapacité des gènes *iroBCDEN* à compléter la carence nutritionnelle en fer de la souche 1017, souche ne possédant plus la capacité de synthétiser l'entérobactine.

Par ailleurs, l'introduction du plasmide pABN1, responsable de la synthèse et de l'incorporation de l'aérobactine, dans la souche 1017 permet à celle-ci de subvenir à ses besoins nutritionnels en fer et ainsi à bien croître dans le milieu de culture. Cette courbe de

croissance démontre l'absence de relation entre les voies de synthèses de l'entérobactine et de l'aérobactine et assure un bon contrôle de l'expérience.

Par la suite, l'inoculation des souches 1017 et ses dérivées sur le milieu CAS est venue renforcer l'hypothèse de la voie de synthèse commune entre l'entérobactine et les salmochelines. En effet, les profils phénotypiques observés chez les souches 1017, 1017 (pACYC184) et 1017 (pIJ20) (*iroBCDEN*) présentent tous une croissance intermédiaire et une absence de production de sidérophore (figure 3.21). La coloration bleue du milieu CAS après la croissance des souches, a permis de conclure à cette défaillance synthétique des sidérophores. Ainsi, la production des salmochelines est inhibée lorsque la voie de synthèse de l'entérobactine est compromise. Cette expérience a donc permis d'établir formellement le lien synthétique entre les deux sidérophores. De plus, l'inoculation de la souche 1017 (pABN1), qui produit l'aérobactine, sur le milieu CAS a démontré une forte croissance et une sécrétion non excessive de sidérophore. Cette souche a en fait servi de témoin positif à l'expérience.

L'étude de l'interrelation entre la production de l'entérobactine et les salmochelines s'est poursuivie avec l'utilisation des souches sauvages, et ce, afin d'établir le rôle de chaque sidérophore pour la virulence des souches dans le modèle d'infection aviaire. Pour ce faire, une mutation dans le gène *entD* a tout d'abord été effectuée chez la souche χ 7122 en utilisant la technique de mutagenèse dirigée développée par Datsenko et Wanner (Datsenko et Wanner, 2000). La réussite de cette mutation a permis de créer deux nouvelles souches, soit QT163 et QT179. La souche QT163 est la souche χ 7122 mutée au niveau du gène *entD* et la souche QT179 a été générée suite à une conjugaison entre la souche χ 7301 et QT163. Le résultat de cette conjugaison a donné la souche QT179 qui possède des mutations dans les gènes *entD*, *tsh*, *iucABCD* et *iutA*.

Suite à la mutagenèse, la production des salmochelines et de l'entérobactine a été testée chez ces souches. En fait, l'analyse en CL/SM des échantillons recueillis indique que les souches QT163 et QT179 ne produisent pas d'entérobactine, de salmochelines et ni aucun de leurs produits dérivés. La mutation du gène *entD*, qui code pour une phosphopantetheinyl transférase, empêche la réaction posttranscriptionnelle du transfert de

la partie phosphopantetheinyl du coenzyme A sur la sérine de la chaîne latérale du domaine PCP de EntB et EntF (figure 1.5) (Gehring, Bradley et Walsh, 1997; Gehring, Mori et Walsh, 1998). En d'autres termes, cette mutation bloque une étape importante dans la formation de l'entérobactine et empêche ainsi la production du sidérophore. En plus d'abolir la formation de l'entérobactine, la mutation au niveau du gène *entD* interfère aussi avec la production des salmochelines. Cette observation permet de conclure à un lien de biosynthèse étroit entre les deux sidérophores. En fait, la synthèse des salmochelines se fait en empruntant la machinerie de l'entérobactine. La très grande ressemblance structurale entre les deux sidérophores suggérait fortement cela. Cependant, au début de nos expériences, les structures des salmochelines n'étaient pas connues, puisque l'article de Bister *et al.* n'était pas encore publié.

Par ailleurs, bien que les voies de synthèses des deux sidérophores possèdent une origine commune, aucune recherche n'a établi la voie de synthèse exacte des salmochelines. En fait, seul l'étude de Bister *et al.* mentionne que seulement *iroB*, qui code pour une glycosyl transférase, est nécessaire pour la formation des salmochelines chez une souche de *E. coli* K-12 qui produit de l'entérobactine (Bister *et al.*, 2004). Cela dit, nul ne sait sur quel substrat agit cette glycosyl transférase. Ainsi, l'ajout d'entérobactine et de DHBS purifiés au milieu de culture pauvre en fer de la souche QT163 a été tenté, afin de vérifier si la formation salmochelines était possible avec ce substrat. Nous n'avons pas observé la production des salmochelines à partir de l'entérobactine et de DHBS purifiés dans nos conditions expérimentales. Cette expérience a aussi été tentée par le groupe de recherche de Bister (Bister *et al.*, 2004). Toutefois, ils ont effectué l'expérience avec une souche mutante pour le gène *aroB* qui est un gène essentiel pour la formation du chorismate et des acides aminés aromatiques. L'utilisation d'une souche mutante dans un des gènes de synthèse de l'entérobactine permet une meilleure interprétation des résultats et constitue un meilleur choix. Néanmoins, tout comme nous, ils n'ont pas observé de production de salmochelines. Ce résultat peut s'expliquer par deux hypothèses. Premièrement, la régulation par Fur peut empêcher la formation des salmochelines puisqu'il a ajout d'une grande quantité d'entérobactine exogène. Ainsi, la souche peut utiliser directement le complexe ferri-entérobactine sans avoir à synthétiser un deuxième sidérophore. Deuxièmement, la formation des précurseurs de l'entérobactine et de l'entérobactine

cyclique nécessite le système NRPS généré par les enzymes EntB, EntE et EntF (Crosa et Walsh, 2002). Le substrat de IroB pourrait être les molécules de DHBS non cyclisées et attachées au domaine PCP ou TE de EntF. Cette dernière hypothèse est également partagée par le groupe de Bister (Bister *et al.*, 2004). Quoi qu'il en soit, les deux hypothèses supposent que soit les salmochelines recyclent les molécules d'entérobactine utilisées, ou qu'elles empruntent la voie de synthèse de celle-ci.

Les sidérophores sont souvent associés à la virulence des souches pathogènes. Par exemple, l'aérobactine participe à la virulence de la souche χ 7122, bien que sa présence ne soit pas totalement essentielle à la virulence de la souche si le système Iro est toujours fonctionnel, et ce, surtout en complémentation multicopie (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003; Warner *et al.*, 1981). Par contre, l'aérobactine est associée à la septicémie aviaire et est retrouvée chez les souches APEC hautement virulentes (Delicato *et al.*, 2003; Dozois *et al.*, 1992; Lafont *et al.*, 1987).

De plus, il existe une certaine controverse concernant l'importance de l'entérobactine pour la virulence des souches pathogènes. Tel qu'il a été mentionné précédemment, plusieurs groupes de recherches ont conclu à un rôle important de l'entérobactine pour l'obtention du fer lors d'une infection par *E. coli*, *S. typhi* et *S. typhimurium* (Furman *et al.*, 1994; Gorbacheva *et al.*, 2001; Kochan, Kvach et Wiles, 1977; Rogers, 1973; Yancey, Breeding et Lankford, 1979). Toutefois, Benjamin et ses collaborateurs soutiennent que l'entérobactine n'est pas nécessaire pour *S. typhimurium* chez le modèle animal de fièvre typhoïde (Benjamin *et al.*, 1985). Par ailleurs, une étude récente de Rabsch et ses collaborateurs a rapporté que seule l'incorporation du DHBS et non de l'entérobactine, qui est cependant un produit de dégradation de l'entérobactine, est requise pour une infection efficace de *S. enterica* chez le modèle murin (Rabsch *et al.*, 2003). Cette étude suggère donc que le récepteur CirA, qui est un récepteur tonB-dépendant, est un déterminant important pour la virulence de la souche *S. enterica*. Toutefois, il a été démontré précédemment par Tsolis et ses collaborateurs qu'une mutation du gène *tonB* n'affecte pas la colonisation du foie et de la rate par *S. typhimurium* chez les souris (Tsolis *et al.*, 1996). Ainsi, un autre paradoxe plane sur l'importance du gène *tonB* pour la virulence des souches *S. enterica*. En somme, ces quelques exemples démontrent bien la controverse de

l'importance de l'ensemble du système de l'entérobactine pour la virulence des souches pathogènes.

D'un autre côté, il a été établi que la présence des gènes *iroBCDEN* est importante pour la virulence de la souche de *E. coli* χ 7122 dans le modèle d'infection aviaire. En effet, il a été démontré que la souche χ 7306 (Tsh-, Aéro- et Iro-) est incapable d'établir une infection chez le poulet, bien qu'elle possède toujours les gènes responsables de la synthèse et de l'utilisation de l'entérobactine. Néanmoins, l'inhibition de virulence est levée avec l'introduction des gènes *iroBCDEN* dans la souche χ 7306. Effectivement, la souche χ 7306 (pYA3661) (*iroBCDEN*) est aussi virulente que la souche χ 7122, puisqu'elles ont été retrouvées dans le foie en quantité similaire. Dans cette même étude, des infections chez le modèle aviaire ont démontré que la souche χ 7303 (Iro-) présentait un phénotype de virulence intermédiaire à la souche sauvage χ 7122. Ce phénotype est d'ailleurs comparable au phénotype observé chez la souche χ 7301 (Tsh- et Aéro-). En d'autres mots, les salmochelines et l'aérobactine semblent contribuer à la virulence de la souche χ 7122 d'une façon cumulative. Ces sidérophores agissent donc en concert et permettent la survie de la souche de *E. coli* χ 7122 lors d'une infection systémique chez les poulets (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003).

Selon ces résultats, les salmochelines semblent jouer un rôle important pour la virulence de la souche en absence de l'aérobactine. De plus, l'entérobactine seule ne semble pas être un sidérophore assez efficace pour permettre à la souche d'implanter une infection chez le modèle aviaire (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). Toutefois, puisque la voie de synthèse des salmochelines est reliée à celle de l'entérobactine, ce dernier est peut-être important pour la pathogénie de la souche. Pour vérifier cette hypothèse, des infections chez le modèle aviaire ont eu lieu avec les souches QT163 (Ent-) et QT179 (Ent-, Tsh- et Aéro-).

Les prélèvements sanguins et tissulaires des poumons, de la rate et du foie ont rendu possible la détection et le dénombrement des diverses souches à l'étude (figure 3.33 à 3.27 et tableau 3.3). Les résultats obtenus ont démontré que la survie dans le sang et la colonisation des organes sont beaucoup plus aisées pour la souche sauvage χ 7122 que pour les souches mutantes χ 7306, QT163 et QT179. La souche χ 7122 ne comporte aucune

mutation et a servi de témoin virulent pour les infections. Par ailleurs, la souche $\chi 7306$ (Tsh-, Aéro- et Iro-) n'a pas été retrouvée dans le sang des animaux 24 h après le début de l'infection et n'a également pas été retrouvée dans les organes prélevés. D'ailleurs, très peu de lésions ont été observées avec cette souche, à l'exception du sac aérien droit où l'inoculation a eu lieu. Les différentes mutations de cette souche ont éliminé totalement les facultés de persistances et infectieuses de cette dernière. Bien que les gènes codant pour la synthèse des sidérophore aérobactine et salmochelines aient été mutés, ceux de l'entérobactine sont restés fonctionnels au sein de la souche $\chi 7306$. L'avirulence de cette souche suggère que l'entérobactine ne contribue pas efficacement à la survie dans le sang et à la colonisation des organes dans le modèle d'infection aviaire.

L'isolement de la souche QT163, qui ne possède qu'une mutation au niveau du gène *entD*, a été possible jusqu'à 24 h après l'inoculation. La souche QT163 est donc mieux adaptée que la souche $\chi 7306$ pour survivre dans la circulation sanguine. De plus, les observations de lésions macroscopiques sur les organes sont plus sévères que celles observées sur la souche $\chi 7306$. En plus, QT163 a été capable de coloniser la rate aussi efficacement que la souche $\chi 7122$. Toutefois, l'établissement de l'infection dans le foie et dans les poumons par QT163 s'est avéré moins fort que par $\chi 7122$. Ces phénotypes ne sont probablement pas dus à la présence du système Iro, mais plutôt à celle de l'aérobactine. En fait, il a été prouvé précédemment par des expériences en spectrométrie de masse que l'abolition de la synthèse de l'entérobactine entraînait automatiquement celle des salmochelines. Il est donc inconcevable que la résistance de la souche QT163 soit attribuable aux salmochelines. Ceci a été confirmé par la souche QT179 qui possède des mutations dans les gènes de synthèses de l'entérobactine, l'aérobactine et dans le gène *tsh*. Les résultats obtenus démontrent clairement que cette souche est incapable de survivre dans le sang et ce même après seulement 6 h après l'infection. La colonisation des organes a été également un échec pour cette souche autant pour l'observation des lésions macroscopiques que pour le compte bactérien. La mutation de l'aérobactine vient donc anéantir complètement la résistance de la souche.

La persistance dans le sang et la colonisation des organes par des souches ne possédant qu'un ou deux sidérophores fonctionnels ont donc été déterminées. Les phénotypes

obtenus suggèrent que l'entérobactine seule n'est pas suffisant pour contribuer efficacement à la virulence de la bactérie. Or, l'arrêt de synthèse de l'entérobactine engendre celle des salmochelines et procure un phénotype intermédiaire de survie à la souche, phénotype attribuable à l'aérobactine. Bref, bien que l'entérobactine ne semble pas contribuer directement à la virulence de la souche sauvage, sa machinerie de synthèse en est particulièrement essentielle, car elle mène à la synthèse des salmochelines grâce aux produits des gènes *iroBCDEN*.

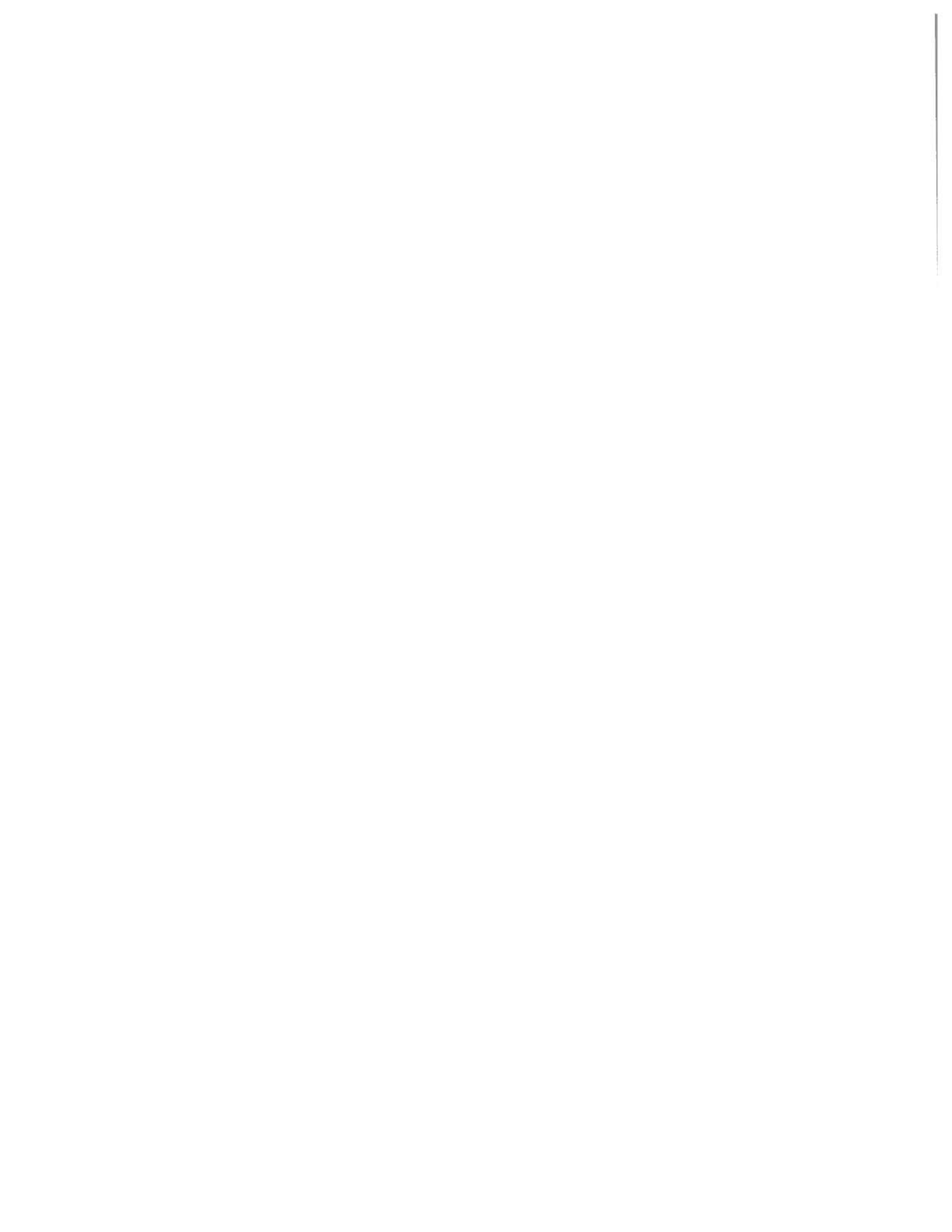
Conclusion

Il a été démontré précédemment que le système Iro est important pour la virulence de la souche $\chi 7122$. Or la caractérisation de chaque gène du système et leur implication lors de l'infection restent encore à éclaircir. Ce projet a donc porté sur la caractérisation des gènes *iroBCDEN* chez la souche *Escherichia coli* pathogène aviaire $\chi 7122$. Quatre volets ont été explorés au cours de cette étude. Tout d'abord, il y a eu la caractérisation du gène *iroN*, ainsi que des gènes *iroD* et *iroE*. Par la suite, le rôle des gènes *iro* pour la production des salmochelines et pour la virulence de la souche a été déterminé. Finalement, l'interrelation entre la synthèse de l'entérobactine et celle des salmochelines, ainsi que son importance lors des infections chez le modèle aviaire ont été examinés.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées suite à ce travail sur la caractérisation des gènes *iroBCDEN* chez la souche *Escherichia coli* pathogène aviaire $\chi 7122$. Tout d'abord, il a été démontré que le récepteur IroN possède la capacité d'internaliser l'entérobactine tout comme les récepteurs FepA et PfeA, mais que IroN présente une sensibilité moindre à la colicine B que le récepteur FepA. Par ailleurs, il a été établi que les trois enzymes, Fes, IroD et IroE, possèdent toutes la capacité de dégrader le complexe ferri-entérobactine, bien que IroE soit plus lent en début de croissance bactérienne. Par ailleurs, la détection des salmochelines chez différentes souches possédant entre trois et cinq gènes *iro* a permis de conclure que les mutations des gènes *iroN* et *iroC* ne semblent pas affecter la production des salmochelines, ni celle de l'entérobactine. Des infections dans le modèle aviaire ont également permis de confirmer que la production et l'incorporation des salmochelines sont des facteurs de virulence qui contribuent à la survie et la prolifération de la souche bactérienne, en plus de démontrer que IroN seul ne contribue pas à la virulence de la souche. Par contre, une mutation au niveau d'un gène *entD*, mutation abolissant la synthèse de l'entérobactine, contrecarre aussi la synthèse des salmochelines. Ceci permet de conclure à un lien de biosynthèse étroit entre les deux sidérophores. Finalement, des infections chez le modèle aviaire ont prouvé que l'entérobactine ne contribue pas directement à la virulence de la souche sauvage, mais que la voie de synthèse de

l'entérobactine contribue à la survie de la souche χ 7122 lors d'une infection systémique chez le poulet.

En outre, ce travail expose quelques réponses à la caractérisation des gènes *iroBCDEN*. Plusieurs questions restent encore en suspens et maintes expériences seront nécessaires afin d'y répondre. Par exemple, il serait intéressant de regarder la dégradation des salmochelines par les estérases IroD, IroE et Fes et leur rôle lors des infections chez les poulets. La caractérisation de *iroC*, son implication probable au niveau de la sécrétion des salmochelines et sa participation à la virulence de la bactérie pathogène sont également des avenues fascinantes à explorer. Finalement, la voie de synthèse des salmochelines et sa relation avec celle de l'entérobactine cachent encore bien des secrets.



Références

- Andrews, S. C., A. K. Robinson et F. Rodriguez-Quinones. 2003. «Bacterial iron homeostasis». FEMS Microbiol Rev, vol. 27, no. 2-3, p. 215-237.
- Azpiroz, M. F., et M. Lavina. 2004. «Involvement of enterobactin synthesis pathway in production of microcin H47». Antimicrob Agents Chemother, vol. 48, no. 4, p. 1235-1241.
- Bauer, R. J., L. Zhang, B. Foxman, A. Siitonen, M. E. Jantunen, H. Saxen et C. F. Marrs. 2002. «Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN*(*E. coli*)». J Infect Dis, vol. 185, no. 10, p. 1521-1524.
- Baumler, A. J., F. Heffron et R. Reissbrodt. 1997. «Rapid detection of *Salmonella enterica* with primers specific for *iroB*». J Clin Microbiol, vol. 35, no. 5, p. 1224-1230.
- Baumler, A. J., T. L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch et F. Heffron. 1998. «*iroN*, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*». J Bacteriol, vol. 180, no. 6, p. 1446-1453.
- Baumler, A. J., R. M. Tsolis, A. W. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic et F. Heffron. 1996. «Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*». Gene, vol. 183, no. 1-2, p. 207-213.
- Benjamin, W. H., Jr., C. L. Turnbough, Jr., B. S. Posey et D. E. Briles. 1985. «The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid». Infect Immun, vol. 50, no. 2, p. 392-397.
- Bindereif, A., et J. B. Neilands. 1983. «Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid ColV». J Bacteriol, vol. 153, no. 2, p. 1111-1113.
- Bister, B., D. Bischoff, G. J. Nicholson, M. Valdebenito, K. Schneider, G. Winkelmann, K. Hantke et R. D. Sussmuth. 2004. «The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*». Biometals, vol. 17, no. 4, p. 471-481.
- Blanco, J. E., M. Blanco, A. Mora et J. Blanco. 1997. «Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with *in vivo* pathogenicity». J Clin Microbiol, vol. 35, no. 11, p. 2953-2957.
- Boyd, E. F., et D. L. Hartl. 1998. «Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution». J Bacteriol, vol. 180, no. 5, p. 1159-1165.
- Braun, V., et M. Braun. 2002a. «Active transport of iron and siderophore antibiotics». Curr Opin Microbiol, vol. 5, no. 2, p. 194-201.
- Braun, V., et M. Braun. 2002b. «Iron transport and signaling in *Escherichia coli*». FEBS Lett, vol. 529, no. 1, p. 78-85.

- Bree, A., M. Dho et J. P. Lafont. 1989. «Comparative infectivity for axenic and specific-pathogen-free chickens of O2 *Escherichia coli* strains with or without virulence factors». Avian Dis, vol. 33, no. 1, p. 134-139.
- Brickman, T. J., et S. K. Armstrong. 1996. «Colicins B and Ia as novel counterselective agents in interspecies conjugal DNA transfers from colicin-sensitive *Escherichia coli* donors to other gram-negative recipient species». Gene, vol. 178, no. 1-2, p. 39-42.
- Brickman, T. J., et M. A. McIntosh. 1992. «Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex». J Biol Chem, vol. 267, no. 17, p. 12350-12355.
- Brock, J. H., M. G. Pickering, M. C. McDowall et A. G. Deacon. 1983. «Role of antibody and enterobactin in controlling growth of *Escherichia coli* in human milk and acquisition of lactoferrin- and transferrin-bound iron by *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 40, no. 2, p. 453-459.
- Brock, J. H., P. H. Williams, J. Liceaga et K. G. Wooldridge. 1991. «Relative availability of transferrin-bound iron and cell-derived iron to aerobactin-producing and enterochelin-producing strains of *Escherichia coli* and to other microorganisms». Infect Immun, vol. 59, no. 9, p. 3185-3190.
- Brown, P. K., et R. Curtiss, 3rd. 1996. «Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 20, p. 11149-11154.
- Brown, P. K., C. M. Dozois, C. A. Nickerson, A. Zuppardo, J. Terlonge et R. Curtiss, 3rd. 2001. «MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*». Mol Microbiol, vol. 41, no. 2, p. 349-363.
- Bullen, J., E. Griffiths, H. Rogers et G. Ward. 2000. «Sepsis: the critical role of iron». Microbes Infect, vol. 2, no. 4, p. 409-415.
- Burton, C. L., S. R. Chhabra, S. Swift, T. J. Baldwin, H. Withers, S. J. Hill et P. Williams. 2002. «The growth response of *Escherichia coli* to neurotransmitters and related catecholamine drugs requires a functional enterobactin biosynthesis and uptake system». Infect Immun, vol. 70, no. 11, p. 5913-5923.
- Cao, Z., et P. E. Klebba. 2002. «Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins». Biochimie, vol. 84, no. 5-6, p. 399-412.
- Carbonetti, N. H., et P. H. Williams. 1984. «A cluster of five genes specifying the aerobactin iron uptake system of plasmid ColV-K30». Infect Immun, vol. 46, no. 1, p. 7-12.
- Chang, A. C., et S. N. Cohen. 1978. «Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid». J Bacteriol, vol. 134, no. 3, p. 1141-1156.

- Chenault, S. S., et C. F. Earhart. 1992. «Identification of hydrophobic proteins FepD and FepG of the *Escherichia coli* ferrienterobactin permease». J Gen Microbiol, vol. 138 (Pt 10), no., p. 2167-2171.
- Clarke, T. E., L. W. Tari et H. J. Vogel. 2001. «Structural biology of bacterial iron uptake systems». Curr Top Med Chem, vol. 1, no. 1, p. 7-30.
- Cowart, R. E., et B. G. Foster. 1985. «Differential effects of iron on the growth of *Listeria monocytogenes*: minimum requirements and mechanism of acquisition». J Infect Dis, vol. 151, no. 4, p. 721-730.
- Crosa, J. H., et C. T. Walsh. 2002. «Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria». Microbiol Mol Biol Rev, vol. 66, no. 2, p. 223-249.
- Daskaleros, P. A., J. A. Stoebner et S. M. Payne. 1991. «Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system». Infect Immun, vol. 59, no. 8, p. 2706-2711.
- Datsenko, K. A., et B. L. Wanner. 2000. «One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 12, p. 6640-6645.
- de Brito, B. G., L. C. Gaziri et M. C. Vidotto. 2003. «Virulence factors and clonal relationships among *Escherichia coli* strains isolated from broiler chickens with cellulitis». Infect Immun, vol. 71, no. 7, p. 4175-4177.
- de Lorenzo, V., A. Bindereif, B. H. Paw et J. B. Neilands. 1986. «Aerobactin biosynthesis and transport genes of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli* K-12». J Bacteriol, vol. 165, no. 2, p. 570-578.
- de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero et J. B. Neilands. 1987. «Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor». J Bacteriol, vol. 169, no. 6, p. 2624-2630.
- Dean, C. R., et K. Poole. 1993. «Cloning and characterization of the ferric enterobactin receptor gene (*pfeA*) of *Pseudomonas aeruginosa*». J Bacteriol, vol. 175, no. 2, p. 317-324.
- Delicato, E. R., B. G. de Brito, L. C. Gaziri et M. C. Vidotto. 2003. «Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis». Vet Microbiol, vol. 94, no. 2, p. 97-103.
- Der Vartanian, M. 1988. «Differences in excretion and efficiency of the aerobactin and enterochelin siderophores in a bovine pathogenic strain of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 56, no. 2, p. 413-418.
- Dho-Moulin, M., et J. M. Fairbrother. 1999. «Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC)». Vet Res, vol. 30, no. 2-3, p. 299-316.

Dozois, C. M., N. Chanteloup, M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels et J. M. Fairbrother. 1994. «Bacterial colonization and *in vivo* expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*». Avian Dis, vol. 38, no. 2, p. 231-239.

Dozois, C. M., et R. Curtiss, 3rd. 1999. «Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream». Vet Res, vol. 30, no. 2-3, p. 157-179.

Dozois, C. M., F. Daigle et R. Curtiss, 3rd. 2003. «Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100, no. 1, p. 247-252.

Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels et R. Curtiss, 3rd. 2000. «Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region». Infect Immun, vol. 68, no. 7, p. 4145-4154.

Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel et M. Bosse. 1992. «pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys». Infect Immun, vol. 60, no. 7, p. 2648-2656.

Dozois, C. M., S. A. Pourbakhsh et J. M. Fairbrother. 1995. «Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry». Vet Microbiol, vol. 45, no. 4, p. 297-309.

Earhart, C. F. 1987. «Ferrienterobactin Transport in *Escherichia coli*». In Iron transport in microbes, plants and animals., p. Weinheim. Federal Republic of Germany.: VCH Verlagsgesellschaft.

Ecker, D. J., B. F. Matzanke et K. N. Raymond. 1986. «Recognition and transport of ferric enterobactin in *Escherichia coli*». J Bacteriol, vol. 167, no. 2, p. 666-673.

Ehmann, D. E., C. A. Shaw-Reid, H. C. Losey et C. T. Walsh. 2000. «The EntF and EntE adenylation domains of *Escherichia coli* enterobactin synthetase: sequestration and selectivity in acyl-AMP transfers to thiolation domain cosubstrates». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 6, p. 2509-2514.

Ellis, M. G., L. H. Arp et S. J. Lamont. 1988. «Serum resistance and virulence of *Escherichia coli* isolated from turkeys». Am J Vet Res, vol. 49, no. 12, p. 2034-2037.

Emery, D. A., K. V. Nagaraja, D. P. Shaw, J. A. Newman et D. G. White. 1992. «Virulence factors of *Escherichia coli* associated with colisepticemia in chickens and turkeys». Avian Dis, vol. 36, no. 3, p. 504-511.

Emody, L., M. Kerenyi et G. Nagy. 2003. «Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*». Int J Antimicrob Agents, vol. 22 Suppl 2, no., p. 29-33.

Evans, R. W., J. B. Crawley, C. L. Joannou et N. D. Sharma. 1999. «Irons Proteins». In Iron and Infection, p. 27-86.

- Faraldo-Gomez, J. D., et M. S. Sansom. 2003. «Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria». Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 4, no. 2, p. 105-116.
- Farthing, M. J. 2004. «Bugs and the gut: an unstable marriage». Best Pract Res Clin Gastroenterol, vol. 18, no. 2, p. 233-239.
- Ferguson, A. D., et J. Deisenhofer. 2002. «TonB-dependent receptors-structural perspectives». Biochim Biophys Acta, vol. 1565, no. 2, p. 318-332.
- Foster, J. W., et H. K. Hall. 1992. «Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis». J Bacteriol, vol. 174, no. 13, p. 4317-4323.
- Foster, J. W., Y. K. Park, I. S. Bang, K. Karem, H. Betts, H. K. Hall et E. Shaw. 1994. «Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella typhimurium*». Microbiology, vol. 140 (Pt 2), no., p. 341-352.
- Freestone, P. P., R. D. Haigh, P. H. Williams et M. Lyte. 2003. «Involvement of enterobactin in norepinephrine-mediated iron supply from transferrin to enterohaemorrhagic *Escherichia coli*». FEMS Microbiol Lett, vol. 222, no. 1, p. 39-43.
- Furman, M., A. Fica, M. Saxena, J. L. Di Fabio et F. C. Cabello. 1994. «*Salmonella typhi* iron uptake mutants are attenuated in mice». Infect Immun, vol. 62, no. 9, p. 4091-4094.
- Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard et M. A. McIntosh. 2002. «Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter». Mol Microbiol, vol. 44, no. 5, p. 1225-1234.
- Gehring, A. M., K. A. Bradley et C. T. Walsh. 1997. «Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate». Biochemistry, vol. 36, no. 28, p. 8495-8503.
- Gehring, A. M., I. Mori et C. T. Walsh. 1998. «Reconstitution and characterization of the *Escherichia coli* enterobactin synthetase from EntB, EntE, and EntF». Biochemistry, vol. 37, no. 8, p. 2648-2659.
- Gorbacheva, V. Y., G. Faundez, H. P. Godfrey et F. C. Cabello. 2001. «Restricted growth of *ent*(-) and *tonB* mutants of *Salmonella enterica* serovar *Typhi* in human Mono Mac 6 monocytic cells». FEMS Microbiol Lett, vol. 196, no. 1, p. 7-11.
- Greenwood, K. T., et R. K. Luke. 1978. «Enzymatic hydrolysis of enterochelin and its iron complex in *Escherichia coli* K-12. Properties of enterochelin esterase». Biochim Biophys Acta, vol. 525, no. 1, p. 209-218.
- Griffiths, E. 1999. «Iron in Biological Systems». In Iron and Infection - Molecular, Physiological and Clinical Aspects, p. 1-26: John Wiley & sons.

Gross, W. G. 1994. «Diseases Due to *Escherichia coli* in Poultry». In *E.coli* in Domestic Animals & Humans, p.: CAB International.

Hacker, J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer et H. Tschape. 1997. «Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact on microbial evolution». *Mol Microbiol*, vol. 23, no. 6, p. 1089-1097.

Hanahan, D., J. Jessee et F. R. Bloom. 1995. «Techniques for transformation of *E. coli*». In DNA cloning I: Core techniques., p. 1-35. New York, N.Y.: Oxford Univ. Press.

Hantke, K. 1990. «Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for *E. coli*». *FEMS Microbiol Lett*, vol. 55, no. 1-2, p. 5-8.

Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch et G. Winkelmann. 2003. «Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IronN». *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 100, no. 7, p. 3677-3682.

Harris, W. R., C. J. Carrano, S. R. Cooper, S. R. Sofen, A. Avdeef, J. V. McArdle et K. N. Raymond. 1979. «Coordination Chemistry of Microbial Iron Transport Compounds. 19. Stability Constants and Electrochemical Behavior of Ferric Enterobactin and Model Complexes». *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 101, no., p. 6097.

Harrison, P. M., et P. Arosio. 1996. «The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation». *Biochim Biophys Acta*, vol. 1275, no. 3, p. 161-203.

Heidinger, S., V. Braun, V. L. Pecoraro et K. N. Raymond. 1983. «Iron supply to *Escherichia coli* by synthetic analogs of enterochelin». *J Bacteriol*, vol. 153, no. 1, p. 109-115.

Heimer, S. R., D. A. Rasko, C. V. Lockett, D. E. Johnson et 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». *Infect Immun*, vol. 72, no. 1, p. 593-597.

Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler et N. C. Andrews. 2004. «Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism». *Cell*, vol. 117, no. 3, p. 285-297.

Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye et T. S. Whittam. 1990. «Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*». *J Bacteriol*, vol. 172, no. 11, p. 6175-6181.

Higgs, P. I., R. A. Larsen et K. Postle. 2002. «Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA». *Mol Microbiol*, vol. 44, no. 1, p. 271-281.

Higgs, P. I., T. E. Letain, K. K. Merriam, N. S. Burke, H. Park, C. Kang et K. Postle. 2002. «TonB interacts with nonreceptor proteins in the outer membrane of *Escherichia coli*». *J Bacteriol*, vol. 184, no. 6, p. 1640-1648.

- Higgs, P. I., P. S. Myers et K. Postle. 1998. «Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers». J Bacteriol, vol. 180, no. 22, p. 6031-6038.
- Hilsenbeck, J. L., H. Park, G. Chen, B. Youn, K. Postle et C. Kang. 2004. «Crystal structure of the cytotoxic bacterial protein colicin B at 2.5 Å resolution». Mol Microbiol, vol. 51, no. 3, p. 711-720.
- Hunt, M. D., G. S. Pettis et M. A. McIntosh. 1994. «Promoter and operator determinants for *fur*-mediated iron regulation in the bidirectional *fepA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system». J Bacteriol, vol. 176, no. 13, p. 3944-3955.
- Jann, K., et B. Jann. 1997. «Capsules of *Escherichia coli*». In *Escherichia coli: Mechanisms of virulence*, p. 113-143. Cambridge: Cambridge University Press.
- Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski et A. L. Stell. 2001. «Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*». J Infect Dis, vol. 183, no. 1, p. 78-88.
- Johnson, J. R., T. A. Russo, P. I. Tarr, U. Carlino, S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr. et A. L. Stell. 2000. «Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis». Infect Immun, vol. 68, no. 5, p. 3040-3047.
- Kado, C. I., et S. T. Liu. 1981. «Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids». J Bacteriol, vol. 145, no. 3, p. 1365-1373.
- Kammler, M., C. Schon et K. Hantke. 1993. «Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*». J Bacteriol, vol. 175, no. 19, p. 6212-6219.
- Kochan, I., J. T. Kvach et T. I. Wiles. 1977. «Virulence-associated acquisition of iron in mammalian serum by *Escherichia coli*». J Infect Dis, vol. 135, no. 4, p. 623-632.
- Kostakioti, M., et C. Stathopoulos. 2004. «Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain». Infect Immun, vol. 72, no. 10, p. 5548-5554.
- La Ragione, R. M., R. J. Collighan et M. J. Woodward. 1999. «Non-curling of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in *csgB* and reduced persistence in poultry infection». FEMS Microbiol Lett, vol. 175, no. 2, p. 247-253.
- La Ragione, R. M., W. A. Cooley et M. J. Woodward. 2000. «The role of fimbriae and flagella in the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants». J Med Microbiol, vol. 49, no. 4, p. 327-338.
- La Ragione, R. M., et M. J. Woodward. 2002. «Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia». Res Vet Sci, vol. 73, no. 1, p. 27-35.

- Lafont, J. P., M. Dho, H. M. D'Hauteville, A. Bree et P. J. Sansonetti. 1987. «Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 55, no. 1, p. 193-197.
- Langman, L., I. G. Young, G. E. Frost, H. Rosenberg et F. Gibson. 1972. «Enterochelin system of iron transport in *Escherichia coli*: mutations affecting ferric-enterochelin esterase». J Bacteriol, vol. 112, no. 3, p. 1142-1149.
- Lavrrar, J. L., et M. A. McIntosh. 2003. «Architecture of a *fur* binding site: a comparative analysis». J Bacteriol, vol. 185, no. 7, p. 2194-2202.
- Letain, T. E., et K. Postle. 1997. «TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*». Mol Microbiol, vol. 24, no. 2, p. 271-283.
- Letoffe, S., P. Delepelaire et C. Wandersman. 2004. «Free and hemophore-bound heme acquisitions through the outer membrane receptor HasR have different requirements for the TonB-ExbB-ExbD complex». J Bacteriol, vol. 186, no. 13, p. 4067-4074.
- Lior, H. 1994. «Classification of *Escherichia coli*». In *Escherichia coli* in Domestic Animals and Humans, p. 31-72. Guelph, Ontario: CAB International.
- Litwin, C. M., et S. B. Calderwood. 1993. «Role of iron in regulation of virulence genes». Clin Microbiol Rev, vol. 6, no. 2, p. 137-149.
- Liu, J., K. Duncan et C. T. Walsh. 1989. «Nucleotide sequence of a cluster of *Escherichia coli* enterobactin biosynthesis genes: identification of *entA* and purification of its product 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase». J Bacteriol, vol. 171, no. 2, p. 791-798.
- Liu, J., N. Quinn, G. A. Berchtold et C. T. Walsh. 1990. «Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate». Biochemistry, vol. 29, no. 6, p. 1417-1425.
- Low, D., B. Braaten et M. Van Der Woude. 1996. «Fimbriae». In *Escherichia coli* and Salmonella, p. chapter 11: ASM Press.
- Marshall, C. G., M. D. Burkart, R. K. Meray et C. T. Walsh. 2002. «Carrier protein recognition in siderophore-producing nonribosomal peptide synthetases». Biochemistry, vol. 41, no. 26, p. 8429-8437.
- McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper et S. C. Andrews. 2003. «Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis». J Biol Chem, vol. 278, no. 32, p. 29478-29486.

- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, P. K. Brown, P. Arne, A. Bree, C. Desautels et J. M. Fairbrother. 2003a. «Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity». Infect Immun, vol. 71, no. 1, p. 536-540.
- Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, 3rd, B. Lehoux et J. M. Fairbrother. 2003b. «Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages». Infect Immun, vol. 71, no. 1, p. 494-503.
- Minschew, B. H., J. Jorgensen, G. W. Counts et S. Falkow. 1978. «Association of hemolysin production, hemagglutination of human erythrocytes, and virulence for chicken embryos of extraintestinal *Escherichia coli* isolates». Infect Immun, vol. 20, no. 1, p. 50-54.
- Muhldorfer, I., et J. Hacker. 1994. «Genetic aspects of *Escherichia coli* virulence». Microb Pathog, vol. 16, no. 3, p. 171-181.
- Nataro J.P., L. M. M. 1994. «*Escherichia coli* Diseases in Humans». In *E.coli* in Domestic animals & Humans, p.: CAB International.
- Negre, V. L., S. Bonacorsi, S. Schubert, P. Bidet, X. Nassif et E. Bingen. 2004. «The siderophore receptor IronN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis». Infect Immun, vol. 72, no. 2, p. 1216-1220.
- Neilands, J. B. 1981. «Microbial iron compounds». Annu Rev Biochem, vol. 50, no., p. 715-731.
- Nikaido, H., et E. Y. Rosenberg. 1990. «Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with beta-lactam antibiotics containing catechol and analogous groups». J Bacteriol, vol. 172, no. 3, p. 1361-1367.
- Nolan, L. K., S. M. Horne, C. W. Giddings, S. L. Foley, T. J. Johnson, A. M. Lynne et J. Skyberg. 2003. «Resistance to serum complement, *iss*, and virulence of avian *Escherichia coli*». Vet Res Commun, vol. 27, no. 2, p. 101-110.
- O'Brien, I. G., G. B. Cox et F. Gibson. 1971. «Enterochelin hydrolysis and iron metabolism in *Escherichia coli*». Biochim Biophys Acta, vol. 237, no. 3, p. 537-549.
- O'Brien, I. G., et F. Gibson. 1970. «The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*». Biochim Biophys Acta, vol. 215, no. 2, p. 393-402.
- Ochman, H., et R. K. Selander. 1984. «Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations». J Bacteriol, vol. 157, no. 2, p. 690-693.

Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt et J. Hacker. 2002. «Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence». Int J Antimicrob Agents, vol. 19, no. 6, p. 517-521.

Okeke, I. N., I. C. Scaletsky, E. H. Soars, L. R. Macfarlane et A. G. Torres. 2004. «Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*». J Clin Microbiol, vol. 42, no. 1, p. 36-44.

Opal, S. M., A. S. Cross, P. Gemski et L. W. Lyhte. 1990. «Aerobactin and alpha-hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool». J Infect Dis, vol. 161, no. 4, p. 794-796.

Otto, B. R., S. J. van Dooren, C. M. Dozois, J. Luirink et B. Oudega. 2002. «*Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*». Infect Immun, vol. 70, no. 1, p. 5-10.

Ozenberger, B. A., T. J. Brickman et M. A. McIntosh. 1989. «Nucleotide sequence of *Escherichia coli* isochorismate synthetase gene *entC* and evolutionary relationship of isochorismate synthetase and other chorismate-utilizing enzymes». J Bacteriol, vol. 171, no. 2, p. 775-783.

Ozenberger, B. A., M. S. Nahlik et M. A. McIntosh. 1987. «Genetic organization of multiple *fep* genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*». J Bacteriol, vol. 169, no. 8, p. 3638-3646.

Parreira, V. R., et C. L. Gyles. 2003. «A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin». Infect Immun, vol. 71, no. 9, p. 5087-5096.

Patzer, S. I., M. R. Baquero, D. Bravo, F. Moreno et K. Hantke. 2003. «The colicin G, H and X determinants encode microcins M and H47, which might utilize the catecholate siderophore receptors *FepA*, *Cir*, *Fiu* and *IronN*». Microbiology, vol. 149, no. Pt 9, p. 2557-2570.

Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion et E. Denamur. 1999. «The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection». Infect Immun, vol. 67, no. 2, p. 546-553.

Pierce, J. R., et C. F. Earhart. 1986. «*Escherichia coli* K-12 envelope proteins specifically required for ferrienterobactin uptake». J Bacteriol, vol. 166, no. 3, p. 930-936.

Pollack, J. R., et J. B. Neilands. 1970. «Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*». Biochem Biophys Res Commun, vol. 38, no. 5, p. 989-992.

Postle, K., et R. J. Kadner. 2003. «Touch and go: tying TonB to transport». Mol Microbiol, vol. 49, no. 4, p. 869-882.

- Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize, C. M. Dozois, C. Desautels et J. M. Fairbrother. 1997a. «Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens». Avian Dis, vol. 41, no. 1, p. 221-233.
- Pourbakhsh, S. A., M. Boulianne, B. Martineau-Doize et J. M. Fairbrother. 1997b. «Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens». Vet Microbiol, vol. 58, no. 2-4, p. 195-213.
- Pourbakhsh, S. A., M. Dho-Moulin, A. Bree, C. Desautels, B. Martineau-Doize et J. M. Fairbrother. 1997c. «Localization of the *in vivo* expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*». Microb Pathog, vol. 22, no. 6, p. 331-341.
- Prescott, Harley et Klein. 1995. Microbiologie. 2e édition édition. Bruxelles: DeBoeck Université, 1014 p.
- Provence, D. L., et R. Curtiss, 3rd. 1992. «Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production». Infect Immun, vol. 60, no. 11, p. 4460-4467.
- Provence, D. L., et R. Curtiss, 3rd. 1994. «Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain». Infect Immun, vol. 62, no. 4, p. 1369-1380.
- Pugsley, A. P., et P. Reeves. 1976a. «Characterization of group B colicin-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12: colicin resistance and the role of enterochelin». J Bacteriol, vol. 127, no. 1, p. 218-228.
- Pugsley, A. P., et P. Reeves. 1976b. «Iron uptake in colicin B-resistant mutants of *Escherichia coli* K-12». J Bacteriol, vol. 126, no. 3, p. 1052-1062.
- Quackenbush, R. L., et S. Falkow. 1979. «Relationship between colicin V activity and virulence in *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 24, no. 2, p. 562-564.
- Rabsch, W., U. Methner, W. Voigt, H. Tschape, R. Reissbrodt et P. H. Williams. 2003. «Role of receptor proteins for enterobactin and 2,3-dihydroxybenzoylserine in virulence of *Salmonella enterica*». Infect Immun, vol. 71, no. 12, p. 6953-6961.
- Rabsch, W., W. Voigt, R. Reissbrodt, R. M. Tsolis et A. J. Baumler. 1999. «*Salmonella typhimurium* IroN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores». J Bacteriol, vol. 181, no. 11, p. 3610-3612.
- Ratledge, C., et L. G. Dover. 2000. «Iron metabolism in pathogenic bacteria». Annu Rev Microbiol, vol. 54, no., p. 881-941.
- Raymond, K. N., E. A. Dertz et S. S. Kim. 2003. «Enterobactin: an archetype for microbial iron transport». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100, no. 7, p. 3584-3588.

- Roberts, C. W., F. Roberts, R. E. Lyons, M. J. Kirisits, E. J. Mui, J. Finnerty, J. J. Johnson, D. J. Ferguson, J. R. Coggins, T. Krell, G. H. Coombs, W. K. Milhous, D. E. Kyle, S. Tzipori, J. Barnwell, J. B. Dame, J. Carlton et R. McLeod. 2002. «The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites». J Infect Dis, vol. 185 Suppl 1, no., p. S25-36.
- Roche, E. D., et C. T. Walsh. 2003. «Dissection of the EntF condensation domain boundary and active site residues in nonribosomal peptide synthesis». Biochemistry, vol. 42, no. 5, p. 1334-1344.
- Rogers, H. J. 1973. «Iron-binding catechols and virulence in *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 7, no. 3, p. 438-444.
- Rossi, M. S., J. D. Fetherston, S. Letoffe, E. Carniel, R. D. Perry et J. M. Ghigo. 2001. «Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*». Infect Immun, vol. 69, no. 11, p. 6707-6717.
- Rusnak, F., W. S. Faraci et C. T. Walsh. 1989. «Subcloning, expression, and purification of the enterobactin biosynthetic enzyme 2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase: demonstration of enzyme-bound (2,3-dihydroxybenzoyl)adenylate product». Biochemistry, vol. 28, no. 17, p. 6827-6835.
- Russo, T. A., U. B. Carlino, A. Mong et S. T. Jodush. 1999. «Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine». Infect Immun, vol. 67, no. 10, p. 5306-5314.
- Russo, T. A., et J. R. Johnson. 2003. «Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem». Microbes Infect, vol. 5, no. 5, p. 449-456.
- Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard et J. R. Johnson. 2002. «IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 70, no. 12, p. 7156-7160.
- Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, R. Olson et G. E. Wilding. 2003. «The Siderophore receptor IroN of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potential vaccine candidate». Infect Immun, vol. 71, no. 12, p. 7164-7169.
- Rutz, J. M., J. Liu, J. A. Lyons, J. Goranson, S. K. Armstrong, M. A. McIntosh, J. B. Feix et P. E. Klebba. 1992. «Formation of a gated channel by a ligand-specific transport protein in the bacterial outer membrane». Science, vol. 258, no. 5081, p. 471-475.
- Sakaitani, M., F. Rusnak, N. R. Quinn, C. Tu, T. B. Frigo, G. A. Berchtold et C. T. Walsh. 1990. «Mechanistic studies on trans-2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase (Ent A) in the biosynthesis of the iron chelator enterobactin». Biochemistry, vol. 29, no. 29, p. 6789-6798.

Schade, A. L., et L. Caroline. 1944. «Raw Hen Egg White and the Role of Iron in Growth Inhibition of *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae*». Science, vol. 100, no., p. 14-15.

Schwyn, B., et J. B. Neilands. 1987. «Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores». Anal Biochem, vol. 160, no. 1, p. 47-56.

Shaw-Reid, C. A., N. L. Kelleher, H. C. Losey, A. M. Gehring, C. Berg et C. T. Walsh. 1999. «Assembly line enzymology by multimodular nonribosomal peptide synthetases: the thioesterase domain of *E. coli* EntF catalyzes both elongation and cyclolactonization». Chem Biol, vol. 6, no. 6, p. 385-400.

Smith, H. W. 1974. «A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V». J Gen Microbiol, vol. 83, no. 0, p. 95-111.

Sorsa, L. J., S. Dufke, J. Heesemann et S. Schubert. 2003. «Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor». Infect Immun, vol. 71, no. 6, p. 3285-3293.

Sprencel, C., Z. Cao, Z. Qi, D. C. Scott, M. A. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K. M. Raymond, S. M. Newton et P. E. Klebba. 2000. «Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB». J Bacteriol, vol. 182, no. 19, p. 5359-5364.

Stathopoulos, C., D. L. Provence et R. Curtiss, 3rd. 1999. «Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters». Infect Immun, vol. 67, no. 2, p. 772-781.

Stephens, D. L., M. D. Choe et C. F. Earhart. 1995. «*Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin». Microbiology, vol. 141 (Pt 7), no., p. 1647-1654.

Stocki, S. L., L. A. Babiuk, N. A. Rawlyk, A. A. Potter et B. J. Allan. 2002. «Identification of genomic differences between *Escherichia coli* strains pathogenic for poultry and *E. coli* K-12 MG1655 using suppression subtractive hybridization analysis». Microb Pathog, vol. 33, no. 6, p. 289-298.

Thulasiraman, P., S. M. Newton, J. Xu, K. N. Raymond, C. Mai, A. Hall, M. A. Montague et P. E. Klebba. 1998. «Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in gram-negative bacteria». J Bacteriol, vol. 180, no. 24, p. 6689-6696.

Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch et S. M. Payne. 2001. «TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse». Infect Immun, vol. 69, no. 10, p. 6179-6185.

Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron et I. Stojiljkovic. 1996. «Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse». Infect Immun, vol. 64, no. 11, p. 4549-4556.

- Usher, K. C., E. Ozkan, K. H. Gardner et J. Deisenhofer. 2001. «The plug domain of FepA, a TonB-dependent transport protein from *Escherichia coli*, binds its siderophore in the absence of the transmembrane barrel domain». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 98, no. 19, p. 10676-10681.
- Vakharia, H. L., et K. Postle. 2002. «FepA with globular domain deletions lacks activity». J Bacteriol, vol. 184, no. 19, p. 5508-5512.
- Valvano, M. A., et J. H. Crosa. 1984. «Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain ColV plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of *Escherichia coli* K1». Infect Immun, vol. 46, no. 1, p. 159-167.
- Vidotto, M. C., E. E. Muller, J. C. de Freitas, A. A. Alfieri, I. G. Guimaraes et D. S. Santos. 1990. «Virulence factors of avian *Escherichia coli*». Avian Dis, vol. 34, no. 3, p. 531-538.
- Warner, P. J., P. H. Williams, A. Bindereif et J. B. Neilands. 1981. «ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 33, no. 2, p. 540-545.
- Waters, V. L., et J. H. Crosa. 1991. «Colicin V virulence plasmids». Microbiol Rev, vol. 55, no. 3, p. 437-450.
- Wawszkiewicz, E. J., et H. A. Schneider. 1975. «Control of salmonellosis pacifarin biosynthesis by iron». Infect Immun, vol. 11, no. 1, p. 69-72.
- White, D. G., M. Dho-Moulin, R. A. Wilson et T. S. Whittam. 1993. «Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin». Microb Pathog, vol. 14, no. 5, p. 399-409.
- Whitfield, C., et I. S. Roberts. 1999. «Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*». Mol Microbiol, vol. 31, no. 5, p. 1307-1319.
- Williams, P. H. 1979. «Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 26, no. 3, p. 925-932.
- Williams, P. H., et N. H. Carbonetti. 1986. «Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 51, no. 3, p. 942-947.
- Winkelmann, G., A. Cansier, W. Beck et G. Jung. 1994. «HPLC separation of enterobactin and linear 2,3-dihydroxybenzoylserine derivatives: a study on mutants of *Escherichia coli* defective in regulation (*fur*), esterase (*fes*) and transport (*fepA*)». Biometals, vol. 7, no. 2, p. 149-154.
- Wooley, R. E., P. S. Gibbs, T. P. Brown, J. R. Glisson, W. L. Steffens et J. J. Maurer. 1998. «Colonization of the chicken trachea by an avirulent avian *Escherichia coli* transformed with plasmid pHK11». Avian Dis, vol. 42, no. 1, p. 194-198.

Wooley, R. E., L. K. Nolan, J. Brown, P. S. Gibbs, C. W. Giddings et K. S. Turner. 1993. «Association of K-1 capsule, smooth lipopolysaccharides, *traT* gene, and Colicin V production with complement resistance and virulence of avian *Escherichia coli*». Avian Dis, vol. 37, no. 4, p. 1092-1096.

Wooley, R. E., K. R. Spears, J. Brown, L. K. Nolan et O. J. Fletcher. 1992. «Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*». Avian Dis, vol. 36, no. 3, p. 679-684.

Yancey, R. J., S. A. Breeding et C. E. Lankford. 1979. «Enterochelin (enterobactin): virulence factor for *Salmonella typhimurium*». Infect Immun, vol. 24, no. 1, p. 174-180.

Zakharov, S. D., et W. A. Cramer. 2002. «Colicin crystal structures: pathways and mechanisms for colicin insertion into membranes». Biochim Biophys Acta, vol. 1565, no. 2, p. 333-346.

Zhou, D., W. D. Hardt et J. E. Galan. 1999. «*Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island». Infect Immun, vol. 67, no. 4, p. 1974-1981.

