

Mourad Sabri

**Identification et caractérisation de l'opéron *sitABCD* et du système
SitABCD, transporteur de fer et de manganèse.**

**Mémoire présenté pour l'obtention du grade Maître ès Sciences (M.Sc.) en
Microbiologie appliquée.**

INRS-Institut Armand Frappier

Laval, Québec, Canada

Décembre 2003

Table des matières :

Section	Page
I Avant propos :	5
II Résumé :	6
III Introduction:	7
IV Revue de la littérature :	9
<i>Taxonomie d'E. coli :</i>	9
<i>Diversité et versatilité des E. coli, clonalité des E. coli :</i>	9
<i>Adaptation aux différents hôtes :</i>	10
<i>Différents types de pathogénicité des souches d'E. coli :</i>	11
<i>Importance du transfert horizontal dans l'acquisition de la virulence :</i>	12
<i>Îlots de pathogénicité :</i>	13
<i>Plasmides de virulence :</i>	13
<i>Les divers facteurs de virulence :</i>	14
<i>Les facteurs de virulence d'E. coli :</i>	16
<i>Importance du fer dans le métabolisme bactérien :</i>	19
<i>Importance du transport du fer :</i>	20
<i>Le transport du Fe³⁺ :</i>	20
<i>Le transport de Fe²⁺ FeoB:</i>	23
<i>Le stockage du fer :</i>	24
<i>Contrôle du métabolisme du fer :</i>	25
<i>Importance du manganèse dans le métabolisme bactérien :</i>	27
<i>Le transporteur du manganèse, MntH:</i>	28
<i>Le transporteur du manganèse, SitABCD :</i>	29
<i>Comparaison de SitABCD et MntH :</i>	31
<i>Autre transport de Mn²⁺ faible affinité :</i>	33
<i>Régulation du transport de Mn²⁺ :</i>	33
<i>Le stockage du manganèse :</i>	33
<i>Manganèse tant que cofacteur enzymatique :</i>	34
<i>Manganèse, fer et stress oxydatif :</i>	34
<i>Redondance des systèmes de transport de Fe²⁺ et de Mn²⁺ :</i>	36
<i>Régulation du fer, du manganèse et la réponse au stress oxydatif :</i>	36
<i>Expression in vivo des transporteurs de Fe²⁺ et Mn²⁺ :</i>	36
V Conclusion de la revue de littérature :	37
VI Procédures expérimentales :	37
<i>Souches bactériennes, plasmides et conditions de croissance utilisées :</i>	37
<i>Souches :</i>	38
<i>Cosmides :</i>	38
<i>Plasmides :</i>	38
<i>Conditions de croissance :</i>	38
<i>Manipulations de l'ADN :</i>	38
<i>Purification de l'ADN :</i>	38
<i>Enzymes de restriction et de modification :</i>	38
<i>Amplification par PCR :</i>	38
<i>Hybridation de la sonde sitA sur l'ADN génomique des souches d'E. coli :</i>	39
<i>Production des sidérophores et croissance en milieu pauvre en fer :</i>	39

<i>CAS Agar et détection de sidérophores :</i>	39
<i>Milieu liquide utilisé lors de la croissance en milieu appauvri en fer :</i>	39
<i>Chélateur utilisé lors de la croissance en milieu pauvre en fer :</i>	39
<i>Le test de croissance en milieu appauvri en fer :</i>	40
<i>Séquençage de l'ADN et analyse de la région sitABCD :</i>	40
<i>Insertion des transposons :</i>	40
<i>Séquençage :</i>	41
<i>Montage des contigs :</i>	40
<i>Analyse bio-informatique des séquences obtenues :</i>	41
<i>Construction des souches mutantes mntH et sitABCD:</i>	41
<i>mntH :</i>	41
<i>sitABCD :</i>	41
<i>Transport des isotopes radioactifs de Fe²⁺ et Mn²⁺ :</i>	42
<i>Protocole général de transport :</i>	42
<i>Appareillage :</i>	43
<i>Fe²⁺ :</i>	43
<i>Mn²⁺ :</i>	43
<i>Transport de Mn²⁺ à températures différentes :</i>	43
<i>Transport de Mn²⁺ à pH différents :</i>	43
<i>Test de sensibilité au H₂O₂ :</i>	43
<i>Prévalence et localisation de sitABCD dans les souches d'E. coli :</i>	43
<i>Infection expérimentale dans le modèle aviaire :</i>	44
<i>Statistiques :</i>	44
VII Résultats :	44
<i>Caractérisation de la région contenant l'opéron sitABCD d'E. coli χ7122 :</i>	44
<i>L'identification de la région sitABCD d'E. coli :</i>	44
<i>L'opéron est situé sur un plasmide de virulence :</i>	45
<i>La séquence de la région sitABCD :</i>	46
<i>La région sitABCD a des caractéristiques d'îlot de pathogénicité :</i>	47
<i>La région du promoteur contient plusieurs séquences régulatrices :</i>	47
<i>Gènes de l'opéron sitABCD et protéines du système SitABCD :</i>	48
<i>Des homologues multiples parmi les autres espèces bactériennes :</i>	49
<i>Transport du fer :</i>	49
<i>Croissance d'un mutant sidérophore négatif complétement par sitABCD :</i>	49
<i>Dans un mutant sidérophore négatif sitABCD entraîne une régulation Fur dépendante :</i>	50
<i>Dans un mutant déficient dans le transport de fer SitABCD permet l'entrée de Fe²⁺ :</i>	50
<i>Transport du manganèse :</i>	51
<i>SitABCD transporte l'isotope radioactif ⁵⁴Mn²⁺ dans une souche mutante mntH :</i>	51
<i>Le transport de Mn²⁺ par SitABCD est un transport actif :</i>	51
<i>Le transport de Mn²⁺ par SitABCD est dépendant du pH du milieu :</i>	51
<i>Résistance au stress oxydatif :</i>	52
<i>SitABCD contribue à la résistance contre la toxicité du H₂O₂ dans un mutant mntH :</i>	52
<i>Distribution de l'opéron sitABCD parmi les souches d'E. coli :</i>	53
<i>L'opéron sitABCD est surtout présent chez les souches ExPEC :</i>	53
<i>L'opéron sitABCD n'est pas exclusivement associé avec un sérotype donné :</i>	53
<i>Chez les APEC, sitABCD est surtout présent chez les souches les plus virulentes :</i>	54
<i>L'opéron sitABCD d'E.coli peut être chromosomique ou plasmidique :</i>	54
<i>Infection dans le modèle expérimental aviaire :</i>	54
VIII Discussion :	55
<i>Les caractéristiques de la région sitABCD de la souche pathogène aviaire χ7122 :</i>	55
<i>L'opéron sitABCD :</i>	55
<i>Les séquences d'insertion IS :</i>	56
<i>Les autres gènes putatifs :</i>	56
<i>La variabilité en contenu G+C :</i>	57

<i>Les plasmides p1658/97, pColV et pAPEC-1:</i>	57
<i>Les homologues du système SitABCD :</i>	57
<i>Les homologues les plus proches :</i>	57
<i>Chez les entérobactéries :</i>	58
<i>Chez les autres familles bactériennes :</i>	58
<i>Origine du système SitABCD d'E. coli :</i>	59
<i>SitABCD transporteur de fer et de manganèse :</i>	59
<i>SitABCD transporteur du fer :</i>	59
<i>SitABCD transporteur du manganèse :</i>	61
<i>Transport du fer et celui du manganèse :</i>	61
<i>SitABCD autant que transporteur potentiel des cations divalents des métaux de transition :</i>	64
<i>Importance du transport des cations métalliques divalents par SitABCD :</i>	65
<i>SitABCD et la résistance à la toxicité induite par H₂O₂ :</i>	65
<i>Mécanismes possibles de la contribution de SitABCD à la gestion du stress oxydatif :</i>	65
<i>Résistance au stress oxydatif et pathogénicité :</i>	66
<i>Distribution de l'opéron sitABCD parmi les diverses souches d'E.coli :</i>	67
<i>SitABCD et les souches extra-intestinales d'E.coli :</i>	67
<i>L'opéron sitABCD et le transfert horizontal par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif :</i>	67
<i>SitABCD et pathogénicité de la souche χ7122 d'E coli :</i>	68
<i>SitABCD intervient dans les étapes extra-intestinales de l'infection :</i>	68
<i>SitABCD de χ7122 est surtout important dans certains sites anatomiques :</i>	68
<i>Rôle possible de SitABCD :</i>	69
<i>SitABCD est un facteur qui contribue à la virulence :</i>	69
IX Conclusion:	70
X Contribution de l'étudiant et autres apports ayant mené à ce mémoire :	71
Annexe I : Tableaux et figures :	72
Annexe II : Liste des abréviations et acronymes.	95
Annexe III : Références bibliographiques :	97

I Avant propos :

Ce mémoire est le résultat de près de deux années de travail, de réussites mais aussi d'échecs des expériences menées, de bonnes intuitions et de choix erronés. Il marque pour son auteur une étape importante franchie sur le chemin de l'acquisition de certaines connaissances mais aussi laisse entrevoir de nombreuses questions nécessitant des réponses encore à venir.

Fait important, ce document n'aurait jamais pu voir le jour sans la patience et la très judicieuse guidance du directeur de recherche, ni d'ailleurs sans l'interaction avec les autres membres du laboratoire voir de l'Institut au complet. Je tiens donc, dès l'abord, à remercier toutes les personnes qui ont bien voulu m'apporter leur aide sur la voie qui a abouti à l'élaboration du présent mémoire.

J'ose espérer que bien qu'imparfait, ce travail permettrait d'approfondir quelque peu la connaissance du sujet dont il traite : le système de transport des ions métalliques divalents SitABCD d'*Escherichia coli* et son possible rôle dans les interactions hôte-pathogène. J'espère de plus que les résultats, énoncés dans les pages qui vont suivre, seront utiles pour des études futures qui apporteront des éclaircissements sur les nombreux aspects encore mal compris du fonctionnement du système étudié. De même, j'ose espérer que ces données seront utiles pour des futures études portant sur le transport des ions dans le monde bactérien et la résistance des bactéries au stress oxydatif. Enfin, ces résultats pourraient contribuer à une meilleure compréhension de l'organisation génétique et de l'expression des facteurs de virulence bactériens, lors du processus infectieux, de même que des interactions hôte-pathogène qui accompagnent le dit processus.

Je dédie le présent mémoire à ma famille, sans qui mes études auraient probablement été simplifiées, mais en absence de qui ma vie aurait été bien vide.

II Résumé :

Nous avons étudié l'opéron *sitABCD* de la souche χ 7122 d'*E. coli* pathogène aviaire et le système SitABCD correspondant, afin d'en faire ressortir les caractéristiques. Notre intérêt s'est porté sur l'étude des caractéristiques de la région de l'opéron *sitABCD* ainsi que des homologues des protéines du système SitABCD. De plus, nous avons testé la capacité de SitABCD à transporter le manganèse et le fer, ainsi que d'intervenir dans la résistance au stress oxydatif induit par le peroxyde d'hydrogène. Enfin, nous avons investigué la prévalence et la localisation de l'opéron *sitABCD* chez différents sous-groupes de souches d'*E. coli*.

Les résultats que nous avons obtenus, indiquent que l'opéron *sitABCD* est largement distribué parmi les souches extra-intestinales pathogènes d'*E. coli* et peut faire partie du chromosome ou être porté par un plasmide. De plus, l'expression de *sitABCD* est probablement dépendante de plusieurs protéines régulatrices, dont les séquences de liaison présomptives font partie du promoteur de cet opéron. Le système SitABCD, quant à lui, appartient à la famille des transporteurs ABC, possède plusieurs homologues parmi différentes espèces bactériennes et transporte le fer et le manganèse. De plus, ce système joue un rôle dans la résistance d'*E. coli* à la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène. Enfin, le mutant *sit* de la souche χ 7122 est atténué dans certains sites anatomiques, lors de l'infection dans le modèle expérimental aviaire. SitABCD se présente donc entant que facteur de virulence potentiel des souches d'*E. coli* pathogènes.

III Introduction :

Escherichia coli est sans aucun doute une des espèces bactériennes qui ont été l'objet des investigations les plus poussées. Les microorganismes appartenant à cette espèce sont souvent présentés comme des bactéries modèles, lors des cours et dans des articles portant sur les aspects les plus divers de la vie bactérienne. Au moment d'écrire ces lignes (novembre 2003), nous avons pu recenser sur le site du NCBI un total de 29784 articles et livres, 12223 séquences nucléotidiques, 43582 protéines, 11975 représentations tridimensionnelles des protéines, 2294 structures macromoléculaires tridimensionnelles et 13 génomes complets (souches bactériennes et phages parasitant celles-ci) dont les informations sont en relation directe avec l'espèce *Escherichia coli*. Nul doute donc qu'il s'agit d'un microorganisme dont l'étude est reliée à des nombreux aspects de la microbiologie. Nous sommes forcés d'admettre que certains seront tentés de se poser la question de la pertinence des études supplémentaires portant sur une bactérie qui a déjà été étudiée de façon aussi extensive. Le fait est que malgré les nombreux résultats obtenus au cours des études précédentes il reste encore chez *E. coli* beaucoup d'aspects mal compris sinon carrément inconnus. *E. coli* reste donc une bactérie caractérisée imparfaitement.

E. coli est une espèce bactérienne pathogène de premier plan chez les humains et les animaux (les tragédies telles que celles de Walkerton sont là pour nous le rappeler). Ceci est dû à la grande variabilité des styles de vie adaptés par les diverses souches d'*E. coli*, les multiples hôtes qu'elles peuvent coloniser (et / ou infecter) ainsi que de nombreuses affections que les souches pathogènes de cette bactérie sont en mesure de causer chez leurs hôtes susceptibles respectifs. Cette variabilité dans les stratégies de survie, adoptées par diverses souches d'*E. coli*, tient avant tout de la variabilité de l'information génétique au sein de cette espèce bactérienne. En effet les génomes complètement séquencés de quatre souches d'*E. coli*, présents sur le site de NCBI, démontrent la présence de gènes conservés communs, mais aussi de séquences génétiques variant grandement d'une souche à l'autre. Cette variabilité permet à chacune de ces souches de posséder et d'utiliser un ensemble de facteurs indispensables à sa survie et multiplication.

Chez les souches pathogènes d'*E. coli*, les facteurs responsables pour la capacité d'infecter leurs hôtes respectifs et de causer des pathologies spécifiques, sont les facteurs de virulence. Ces facteurs sont associés à des îlots de pathogénicité qui sont des séquences génétiques particulières portant des gènes impliqués dans le processus infectieux ou encore des plasmides de virulence : éléments génétiques accessoires qui peuvent encoder plusieurs facteurs de virulence. La présence des plasmides est surtout importante pour les souches APEC (souches pathogènes aviaires) et EHEC (souches entéro-hémorragiques) d'*E. coli*, ainsi que d'autres espèces pathogènes, telles que *S. flexneri* ou *S. typhimurium*. La complexité des processus qui mènent à l'implication des divers éléments génétiques dans l'infection, n'est actuellement que très partiellement comprise. En effet, le schéma de régulation de l'expression des gènes codant pour les facteurs de virulence, l'interaction de ces différents facteurs (dont les fonctions peuvent être redondantes) et les mécanismes exacts des diverses interactions moléculaires de ces facteurs avec les cellules et l'organisme de l'hôte en général, sont autant de sujets d'étude lors de l'analyse de la virulence d'une bactérie pathogène. Ces études sont compliquées de part le fait que les expériences *in vitro* ne puissent à elles seules suffire à démontrer le rôle d'un facteur de virulence dans la pathogénie. Ce type d'expérience sert surtout à fournir l'indication quant à l'implication possible d'un système donné dans la virulence.

Il est impératif de pouvoir utiliser un modèle infectieux *in vivo*, afin d'arriver à une vision plus claire de l'apport du système étudié à la pathogénie. De plus, les fonctions les plus importantes pour l'établissement d'un processus infectieux, sont souvent prises en charge de façon redondante par plusieurs facteurs de virulence différents. Ceci peut aboutir au masquage de l'effet d'un facteur de virulence donné par la présence d'autres facteurs accomplissant une fonction semblable. D'où la fréquente nécessité d'avoir des souches mutées pour plus d'un facteur de virulence, afin de clarifier l'apport de chacun de ces facteurs à la virulence. Considérant le fait que les facteurs de virulence des souches d'*E. coli* soient nombreux, variables d'une souche à l'autre et diversifiés dans leurs effets, il apparaît clair que bien des lacunes restent encore dans notre vision des interactions des souches pathogènes d'*E. coli* avec leurs organismes hôtes respectifs.

Dans le cadre de notre étude nous avons utilisé la souche pathogène aviaire $\chi 7122$, ainsi que des souches non-pathogènes K-12 d'*E. coli in vitro* et dans un modèle d'infection aviaire pour l'étude portant sur l'identification et la caractérisation partielle d'un facteur de virulence : le système de transport des ions métalliques divalents SitABCD. Dans les pages qui suivent, nous allons avant tout faire une revue de notre sujet d'étude, tel que présenté dans la littérature scientifique actuelle, puis nous décrirons les méthodes expérimentales que nous avons choisies, ensuite nous présenterons les résultats obtenus qui seront discutés ultérieurement afin de terminer par une conclusion globale, tout en envisageant les pistes intéressantes pour des projets futurs découlant de notre étude.

IV Revue de la littérature :

Taxonomie d'*E. coli* :

Décrite pour la première fois en 1885 par Théodore Escherich qui l'a nommé *Bacterium coli commune*, puis renommée *Escherichia coli* en 1895 par Migula, l'espèce *Escherichia coli* appartient au genre *Escherichia* de la famille des *Enterobacteriaceae* qui à son tour fait partie de l'ordre des *Enterobacteriales*, de l'embranchement des Protéobactéries γ rattaché au sous-règne des Protéobactéries, du règne des Bactéries (8). *E. coli* est une espèce anaérobie facultative, se présentant au microscope optique en tant que bâtonnet de 2 à 6 μm de long sur 1,1 à 1,5 μm de large. C'est un firmicute, donc de coloration Gram-négative, dont le plus proche parent au niveau génétique est le genre *Shigella*, que certains bactériologistes considèrent d'ailleurs en tant que sous-espèce du genre *Escherichia* (92 chap.21).

Diversité et versatilité des *E. coli*, clonalité des *E. coli* :

E. coli est une espèce ubiquitaire au niveau de la microflore intestinale de différents animaux et se subdivise en un ensemble de souches, dont certaines sont commensales et d'autres pathogènes (77 chapitre 148). *E. coli* est une espèce versatile sur le plan de l'adaptabilité aux conditions environnementales, de même qu'aux différents hôtes. Cette versatilité est due au caractère clonal de la population d'*E. coli* (29, 38, 77

chap.145). En effet, celle-ci se compose de groupes clonaux qui, bien qu'ayant, dans un passé reculé, un ancêtre commun, aient divergé dans le courant de l'évolution. Cette divergence est due à la sélection de changements génétiques, tels les insertions, délétions et mutations ponctuelles, apportant des adaptations aux conditions des niches écologiques occupées par les différents clones. La variabilité génétique est de plus modulée par la recombinaison au sein des génomes bactériens (28, 77 chap.145). Enfin, le transfert horizontal des séquences génétiques, mobilisées par des éléments génétiques tels que les transposons, plasmides ou encore les phages tempérés, permet l'échange de matériel génétique entre les souches et même des espèces différentes occupant la même niche écologique (83). Tous les mécanismes évoqués contribuent au caractère hautement mosaïque des génomes des diverses souches d'*E. coli* (29, 39, 77 chap.142).

La plasticité de l'information génétique confère à *E. coli* un avantage évolutif évident. En effet, ceci permet à l'espèce d'occuper différentes niches écologiques et de survivre dans une variété d'environnements que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur de l'organisme hôte (37, 77 chapitres. 142/145/148). Afin de souligner la diversité des souches d'*E. coli*, il est utile de rapporter les résultats obtenus lors de la comparaison récente des génomes complets de trois souches d'*E. coli* provenant d'échantillons prélevés chez l'humain : une souche K-12 commensale MG1655, une souche uropathogène CFT073 et la souche O157:H7 entero-hémorragique EDL933. Les chercheurs sont arrivés à la conclusion que les trois souches n'avaient en commun qu'environ 39% des protéines non redondantes totales, déduites à partir des séquences de leurs génomes. Environ 12% des protéines étaient communes à deux souches sur trois. Enfin, environ 47% des protéines restantes étaient uniques à l'une des trois souches avec la distribution suivante : environ 8% de protéines spécifiques à MG1655, environ 18% de protéines exclusives à EDL933 et environ 21% spécifiques à CFT073 (114). Ces données illustrent l'hétérogénéité du matériel génétique au sein de l'espèce *E. coli* et soulignent l'importance de l'évolution subie par les souches afin de s'adapter à un style de vie commensal ou acquérir la capacité de causer des infections chez l'humain. La clonalité des différentes souches d'*E. coli* est confirmée par l'électrophorèse enzymatique à loci multiples (MLEE pour multilocus enzymatic electrophoresis) (29, 37, 77 chapitre 145).

Adaptation aux différents hôtes :

Sur le plan de l'adaptation aux différents hôtes, nous avons déjà mentionné le caractère versatile d'*E. coli*. Des souches de clonalité différente infectent des hôtes distincts : par exemple les *E. coli* infectant les lapins (REPEC pour rabbit enteropathogenic *E. coli*) ou encore celles infectant la volaille (APEC pour avian pathogenic *E. coli*) (26, 81). Les souches appartenant à chacun de ces deux groupes forment deux ensembles distincts qui possèdent des caractéristiques génétiques partagées par les souches appartenant au groupe mais différant des autres groupes (29, 54, 65). Elles provoquent des pathologies différentes chez deux types d'hôtes distincts. Lors du passage d'un hôte susceptible à un autre non susceptible les souches perdent l'essentiel de leur potentiel pathogène, car leurs facteurs de virulence sont adaptés aux niches d'un hôte donné (77 chapitre 154). Par exemple, les adhésines peuvent être spécifiques d'un ligand cellulaire présent chez un hôte mais absent chez un autre (29, 39). Ainsi, une souche peut se comporter en tant que commensal inoffensif chez un hôte, mais être un pathogène virulent chez un autre (77 chapitre 154).

À l'intérieur d'un même organisme, les facteurs de pathogénicité sont diversement exprimés dans des sites anatomiques différents (77 chapitre 154). Ainsi, dans le cas des souches ExPEC (souches pathogéniques extra-intestinales) et APEC (pathogènes aviaires) il peut y avoir passage d'un état commensal d'une souche dans l'intestin à un état pathogène, virulent dans un site anatomique extra-intestinal (26, 55, 98). Il existe bien sûr des souches capables d'infecter un ensemble d'hôtes différents comme par exemple les *E. coli* ExPEC chez l'humain et le chien, ainsi que des souches qui ne présentent pas de pouvoir pathogène particulier (27, 37, 54).

Différents types de pathogénicité des souches d'*E. coli* :

Du point de vue de la pathogénicité on distingue plusieurs groupes de souches d'*E. coli*, dont chacun est responsable d'un type particulier de processus infectieux, chez un ou plusieurs hôtes.

Nous pouvons réunir tous ces groupes de souches d'*E. coli* en deux grands ensembles, les *E. coli* intestinales ou entériques (EPEC) et les *E. coli* extra-intestinales (ExPEC) (54, 55, 91, 98). Chacun de ces deux groupes peut être subdivisé en sous-groupes causant des infections spécifiques.

Parmi les souches intestinales se classent toutes les souches dont les pathologies impliquent une manifestation de symptômes entériques. Ainsi, les souches entéro-toxinogènes (ETEC pour enterotoxinogenic *E. coli*) provoquent la diarrhée des voyageurs, la diarrhée porcine et la diarrhée chez les veaux.(27, 76, 96). Les souches entéro-agrégatives (EAEC) causent la diarrhée persistante (29, 76, 77 chapitres. 148/149). Les souches entéro-pathogènes (EPEC) causent la diarrhée aqueuse chez les enfants ainsi que chez les animaux (29, 76, 77). Les souches entéro-invasives (EIEC) causent la dysenterie et les infections intestinales avec des lésions invasives de la paroi, ces souches sont apparentées au genre *Shigella* (29, 76, 87). Les REPEC déjà citées sont aussi à classer dans les souches entéro-pathogènes. Enfin, les souches entéro-hémorragiques (EHEC) sont responsables de la colite hémorragique et du syndrome hémolytique urémique et comportent un stade rénal d'infection dû aux shiga-toxines (toxines appartenant au groupe des vero-toxines) entrant dans le système circulatoire (29, 77 chapitre 152). Les souches EPEC et EHEC sont parfois conjointement décrites comme des *E. coli* attachant/effaçant (EAEC) par référence aux lésions que ces souches provoquent au niveau de la muqueuse intestinale (29, 77 chapitre 149).

Parmi les souches extra-intestinales nous retrouvons les souches uropathogènes (UPEC) responsables des infections du tractus urinaire chez les humains, les chats et les chiens, ainsi que les souches responsables de la méningite néonatale chez l'humain et les souches causant la septicémie chez l'humain et l'animal. Enfin, les APEC déjà citées, appartiennent aussi aux souches extra-intestinales (29, 82,91).

Importance du transfert horizontal dans l'acquisition de la virulence :

Étant donné que la taille des génomes des souches d'*E. coli* est variable, les génomes les plus larges ayant environ 1 Mb d'information génétique de plus que les génomes les plus petits, on suppose que la différence de taille est avant tout due à l'acquisition de l'ADN étranger par le biais de transfert horizontal ou la modification du bagage génétique d'une souche par la perte de séquences génétiques.

Les génomes les plus larges appartiennent aux souches pathogènes d'*E. coli*, dont la survie nécessite une adaptation aux niches spécifiques, ainsi que des systèmes spécifiques contribuant à la virulence. Néanmoins, même chez la souche K-12 MG1655, on estime qu'environ 17% du génome provient de transfert horizontal (28, 29, 37, 38, 39).

Les séquences acquises par transfert horizontal présentent fréquemment des caractéristiques qui permettent de les distinguer par rapport au reste du génome. C'est en particulier le cas de larges régions d'ADN présentes dans le génome des souches pathogènes, mais absentes des souches commensales, qui portent des gènes codant pour les facteurs de virulence et qui sont nommées îlots de pathogénicité (PAI pour pathogenicity associated island) (28, 29, 30).

Îlots de pathogénicité :

Les caractéristiques spécifiques des îlots de pathogénicité les plus fréquemment observées, sont la différence en contenu G+C de ces régions par rapport au contenu moyen du reste du génome, l'association fréquente de ces régions avec des loci d'ARNt et la présence dans leurs environs immédiats des gènes de phages tempérés ou de pseudophages, ainsi que de séquences d'insertion (IS), telles les transposons et les intégrases, complètes ou partielles (28, 29).

Les PAI portent souvent les gènes des divers facteurs de virulence, par exemple le PAI-6 de CFT073 porte les gènes *hly* et *pap* codant respectivement pour une hémolysine et une adhésine (114). La taille des PAI peut être très différente, chez les souches d'*E. coli* elle varie d'environ 20 kb à plus de 170 kb (28, 29). Les PAI sont parfois des régions instables et mosaïques qui peuvent subir des réarrangements importants (28, 29, 114). Outre les PAI, les facteurs de pathogénicité peuvent aussi être situés sur des plasmides de virulence (29, 30, 54).

Plasmides de virulence :

Les plasmides de virulence sont des éléments importants pour la pathogénicité de certaines souches d'*E. coli*, de même que d'autres espèces pathogènes (29, 30, 54). En effet, ces plasmides peuvent porter des facteurs de virulence, plus ou moins nombreux en

fonction de leur taille, de même que des cassettes contenant des gènes de résistance aux antibiotiques.

Dans le cas de la souche APEC χ 7122, on constate la présence de trois plasmides; pAPEC-1, 2 et 3, dont la taille varie d'environ 70 kb pour pAPEC-3 à plus de 130 kb pour pAPEC-1 (26, 31). Ces plasmides sont, entre autres, responsables de la capacité de la souche de produire et d'utiliser le sidérophore aérobactine (pAPEC-1), de même que d'utiliser et transformer l'entérobactine grâce au locus *iro* (pAPEC-1), produire l'autotransporteur Tsh responsable de l'hémagglutination thermosensible des érythrocytes de poulet, produire la colicine-V (pAPEC-1) et résister à la streptomycine (pAPEC-2) (6, 26, 30, 31, 45, 104).

Les plasmides de virulence contiennent fréquemment des séquences répétitives, qui comme les séquences d'insertion (IS) peuvent permettre la recombinaison menant à l'insertion d'une partie ou de tout le plasmide dans le chromosome. Cette incorporation de séquences plasmidiques dans le chromosome est une des voies additionnelles menant à l'apparition des îlots de pathogénicité (28, 29). Enfin, certains de ces plasmides sont conjugatifs ou mobilisables ce qui permet le transfert de facteurs de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques d'une souche à une autre et mène à la diffusion de ces déterminants génétiques au sein de la population d'*E. coli* (56 chapitre 3, 118). Chez d'autres espèces les plasmides de virulence jouent aussi un rôle important, ainsi chez *Shigella flexneri* le système de transport de type III, indispensable à l'invasion à travers la paroi intestinale, est encodé par des gènes portés sur un plasmide de virulence (53, 113). De même chez *S. typhimurium* les gènes *spv* codant pour une toxine sont aussi placés sur un plasmide de virulence (77 chapitre 149).

Les divers facteurs de virulence :

Lors d'un processus infectieux, les agents pathogènes (dont les bactéries) doivent pouvoir envahir les sites anatomiques propices de l'organisme hôte, s'y établir de façon durable en échappant aux mécanismes de défense de l'hôte et s'y reproduire (77 chapitre 151, 92 chapitre 30). Cette succession d'étapes menant à une infection correspond à la transmission, suivie par la fixation et la colonisation, puis parfois par l'invasion des tissus de l'hôte et enfin par le développement et la multiplication de l'agent pathogène dont

la présence ou les produits provoquent chez l'hôte l'état morbide communément nommé maladie (92 chapitre 30).

Il est évident qu'un agent pathogène doit posséder les gènes encodant les facteurs de virulence et de résistance aux conditions environnementales, nécessaires pour compléter les étapes décrites (77 chapitre 154, 92 chapitre 30). Ainsi, les facteurs qui permettront au pathogène de survivre dans le milieu externe faciliteront sa transmission à un hôte susceptible (28, 29, 37, 118). Puis, les adhésines qui permettront la fixation du pathogène aux cellules épithéliales, la matrice extracellulaire ou aux muqueuses de l'hôte rendront plus facile la colonisation subséquente de l'hôte (77 chapitre 152, 92 chapitre 30).

Parallèlement, les senseurs spécifiques conféreront aux souches pathogènes la capacité de détecter les changements dans l'environnement et permettront la régulation de l'expression des gènes de virulence, afin de s'adapter aux différents sites anatomiques et aux stress divers que la bactérie pourrait rencontrer lors du cheminement du processus infectieux (77 chapitre 152, 92 chapitre 30). Ainsi, les toxines pourront mener à l'apparition des lésions qui faciliteront l'invasion tissulaire, la résistance contre les cellules immunitaires et la spoliation des nutriments de l'hôte au profit du pathogène (77 chap.152,92 chap.30). De plus, les récepteurs et transporteurs appropriés seront nécessaires à l'acquisition des nutriments et éléments nutritifs nécessaires à la survie et multiplication du pathogène lors des différentes étapes du processus infectieux (77 chap. 152, 92 chap.30) Enfin, des éléments spécifiques de la paroi des bactéries virulentes leur permettront de résister à l'effet bactéricide du complément, la phagocytose et aussi d'aboutir au camouflage du pathogène (par des molécules empruntées à l'hôte ou produites par la bactérie mais faiblement immunogènes), ce qui aurait pour effet la diminution de réponse immunitaire (77 chap.152, 92 chap.30).

L'ensemble des facteurs de virulence est coordonné par un réseau de facteurs de régulation actifs en trans ou d'éléments génétiques qui interviennent en cis sur l'expression des gènes des déterminants de virulence (67 chap.11, 77 chap.152, 88 chap.4, 92 chap.30).

Les facteurs de virulence d'*E. coli* :

Les souches pathogènes d'*E. coli* ont acquis durant leur évolution de nombreux déterminants de pathogénicité. Des facteurs de virulence intervenant à toutes les étapes du processus infectieux, de même que dans différents types d'infection, peuvent être décrits chez les diverses souches d'*E. coli*. Ainsi, *E. coli* est capable de produire différents types d'adhésines, par exemple les fimbriae (pili) de type I, P, S, les curli et d'autres (77 chapitre 150).

De nombreux senseurs permettent à *E. coli* de s'adapter à son environnement dont par exemple le système à deux composantes PhoB/R permettant de s'adapter à la variation de la concentration en phosphate inorganique extra-cellulaire et d'en contrôler le transport (77 chapitre 154, 92 chapitre 30). La totalité des protéines régulatrices peuvent être classées en plusieurs familles types; δ^{70} , LysR, XylS/AraC, Y box, CRP et le système de régulation à deux composantes TCP (pour two component system) (77 chapitre 80). La famille δ^{70} est particulièrement importante car elle contient les facteurs de transcription alternatifs δ qui en s'associant à l'ARN-polymérase et en remplaçant la sous-unité constitutive δ^{70} modulent l'expression des différents gènes (67 chapitre 11). Dans cette famille δ^{28} (aussi appelée δ^F) contrôle la production de certaines adhésines et flagelles et donc la chimotaxie. Un autre exemple de facteur alternatif de transcription est RpoS (aussi appelée δ^S) qui permet l'adaptation des cellules aux divers stimuli entraînant la phase stationnaire lors de la croissance des populations cellulaires d'*E. coli*.

Les schémas de régulation sont complexes et font souvent intervenir plusieurs niveaux successifs et plusieurs sentiers alternatifs pour aboutir au contrôle d'un régulon, un ensemble de gènes co-régulés en réponse à un stress ou un stimulus donné. Le contrôle exercé au niveau des régulons permet d'ajuster rapidement l'état physiologique de la cellule au changement des conditions de vie.

La liste non exhaustive des divers stimuli environnementaux influençant l'expression des facteurs de virulence se présente comme suit : la baisse de la quantité de fer, stress oxydatif, changement de sources de carbone, variation de la composition et de la concentration des acides aminés, variation de pH, variation de température, variation d'osmolarité etc. Ces régulateurs globaux interviennent dans la régulation des facteurs de

virulence, bien que leur action dépasse largement le processus infectieux (67 chapitre 11, 77 chapitre 154, 92 chapitre 30).

En ce qui concerne la production des toxines par *E. coli*, celle-ci varie d'un groupe de souches à un autre, mais aussi en fonction des sites anatomiques et de l'environnement cellulaire des bactéries. Les toxines produites par les diverses souches d'*E. coli* en plus de la partie endotoxine du lipopolysaccharide commun aux entérobactéries (lipide A) sont : les toxines thermolabiles, les toxines thermostables, les shiga-toxines, les α -hémolysines, le facteur cytotoxique nécrosant (CNF), et enfin les toxines cytolétales distendantes. De plus, certains groupes d'*E. coli* produisent des toxines particulières : les enterohémolysines des EHEC, les enterotoxines et les cytotoxines des EIEC, les toxines stables des EAEC (les *E. coli* entero-agrégatives). Pour certaines de ces toxines le mode de fonctionnement est défini expérimentalement, pour d'autres il est déduit par l'association des souches productrices des toxines avec l'épidémie. Le mode d'action de ces toxines peut-être subdivisé en plusieurs groupes suivants : facilitant l'invasion tissulaire, lysant les cellules de l'hôte (α -hémolysine), bloquant la synthèse protéique (shiga-toxines), module les activités cellulaires normales (toxines thermolabiles). Globalement, ces toxines atteignent la cible moléculaire de prédilection, endommagent les tissus ou perturbent le fonctionnement cellulaire et adaptent l'environnement cellulaire pour les besoins du pathogène, en facilitant ainsi l'infection (77 chapitre 152, 92 chapitre 30).

La protection d'*E. coli* contre les défenses de l'hôte implique plusieurs mécanismes, dont l'élaboration de la capsule (antigènes K), la présence de certains types de LPS à chaînes longues (antigènes O) et la protection contre l'effet toxique des radicaux libres d'oxygène et d'azote nous semblent être de première importance. Ces facteurs de virulence sont surtout importants chez les souches extra-intestinales d'*E. coli*. En effet, ces souches lors des infections dans certains sites anatomiques; reins et méninges chez l'humain, sacs aériens et péricarde ainsi que rate chez la volaille, circulation sanguine lors de la septicémie, sont en contact avec les cellules immunitaires et le système du complément. Ce qui explique la capacité qu'ont ces souches d'évader la phagocytose et l'opsonisation et l'effet bactéricide du complément ainsi que le stress oxydatif généré par des phagocytes. Les antigènes de surface des cellules d'*E. coli* sont hautement polymorphiques (on ne compte pas moins de 160 antigènes-O somatiques, 80

antigènes capsulaires K et 60 antigènes flagellaires-H) (77 chapitre 148). En ce qui concerne la capsule qui sert de protection contre le complément ainsi qu'à l'évasion de la phagocytose, il semblerait que seuls les types capsulaires appartenant au groupe II tels que K1, K2, K3, K5 and K12 et K13 soient associés à des infections extra-intestinales chez l'humain. En particulier, ce sont les capsules K1 et K5 composées d'acide polysialique qui se retrouvent le plus fréquemment chez les souches extra-intestinales. Ces capsules mimeraient l'acide sialique qui est un des constituants majeurs de la couche des polysaccharides recouvrant les cellules des mammifères. Ce mimétisme rendrait la cellule bactérienne moins susceptible de subir l'action du complément et la phagocytose (77 chapitre .9).

Certains types de LPS comportant des antigènes O spécifiques ont aussi été associés avec des infections extra-intestinales. Par exemple les souches les plus virulentes d'APEC appartiennent aux sérogroupes O1, O2 et O78 des antigènes-O (71,72). Quant aux défenses contre le stress oxydatif, elles comprennent les enzymes tels que la catalase, la peroxydase, la superoxyde-dismutase et la superoxyde-réductase, de même que les récepteurs et les systèmes de transport pour leurs cofacteurs ioniques respectifs. Ces systèmes, que nous détaillerons ultérieurement, sont nécessaires non seulement lors du processus infectieux mais aussi lors de la croissance aérobie d'*E. coli* (77 chapitre 95, 92 chapitre 30).

Les récepteurs et transporteurs divers d'*E. coli*, pouvant participer au processus infectieux sont très nombreux, de plus l'utilisation de ces protéines de la membrane externe et du périplasme ne se limite pas aux processus infectieux mais déborde largement le cadre de la pathogénicité. En effet, le rôle global de tous ces systèmes étant de pourvoir les cellules bactériennes en nutriments et éléments inorganiques indispensables, il apparaît évident qu'ils sont importants autant à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'organisme hôte (77 chapitre 151, 92 chapitre 30).

La description de tous les systèmes dépasse largement le cadre de notre document. Néanmoins, étant donné qu'en leur absence le processus infectieux est voué à l'échec, nous avons considéré important de les citer parmi les facteurs de virulence potentiels (28, 29, 37, 77 chapitre 154).

Parmi les systèmes orientés vers l'acquisition des nutriments et des éléments inorganiques indispensables à la survie bactérienne et au succès d'un processus infectieux

nous allons dans les pages qui suivent se pencher d'une façon détaillée sur la capture et le transport des ions métalliques, plus particulièrement sur celles de fer et de manganèse (1, 32, 51, 77 chapitre 71, 62, 87). En effet, bien que l'acquisition de ces minéraux soit importante aussi dans l'environnement, dans l'hôte ces systèmes sont indispensables et ont une implication profonde dans la virulence.

Nous allons aussi discuter plus en détail les transporteurs de type ABC (ATP-binding cassette) qui sont la famille la plus large des transporteurs procaryotes, mais aussi eucaryotes et dont le système SitABCD fait partie (20, 77, 88 chapitre 9).

Importance du fer dans le métabolisme bactérien :

Le fer est important pour des nombreux processus cellulaires. En effet, le fer fait partie du site catalytique de trois différentes classes de protéines; les protéines comprenant un groupement hème, les protéines fer-soufre et les protéines non-hème, non-fer-soufre.(1, 77 chapitre 71) Les protéines à groupement hème participent au transport des électrons (cytochromes), à l'activation de l'oxygène (cytochrome oxydase) et la réduction de H₂O₂ (catalase et peroxydase) (1, 77 chapitre 71). Les protéines fer-soufre quant à elles interviennent aussi dans le transport des électrons (ferredoxine), dans la synthèse des acides aminés (glutamate synthétase), le cycle de Krebs (aconitase, succinate déhydrogénase) et la synthèse de la pyrimidine (dihydroorotate déhydrogénase) (1, 77 chap.71). Enfin, les protéines non-hème, non-fer-soufre permettent la synthèse de l'ADN (ribonucléotide réductase), la synthèse des acides aminés aromatiques (l'acide 3-deoxy-D-arabinohéptulosonique 7-phosphate synthétase) et la neutralisation des radicaux superoxyde (superoxyde dismutase Fe-SOD) (1, 77 chapitre 95).

Toutes ces activités catalytiques sont rendues possibles car le fer forme facilement des complexes avec des ligands comportant des groupements oxygénés, soufrés et azotés (1, 77 chapitre 95). Ces complexes pourront ensuite subir des réactions acide-base avec des transferts d'électrons. De plus en fonction de l'environnement protéique qui entoure le site réactif autours du complexe, le fer complexé pourrait adopter des nombreux potentiels RedOx Fe(III)/Fe(II). C'est aussi grâce à ce potentiel réactif que les cations libres de fer peuvent contribuer à la réaction de Fenton qui produit des radicaux hydroxydes dommageables pour la cellule [Fe(II) + H₂O₂ → Fe(III) + OH⁻ + OH·]. D'ou la nécessité d'un control stricte de la quantité et d'une mise en réserve sécuritaire du fer

cellulaire sous forme liée aux diverses protéines citées ainsi que dans deux protéines spécifiques : bacterioferritine (BFR) et ferritine (FRT). (77 chapitre 71, 49, 108)

Importance du transport du fer :

Le fer est le quatrième élément selon son abondance absolue dans la lithosphère terrestre et des concentrations micromolaires suffisent pour la croissance des bactéries (12). Sous sa forme Fe^{2+} , le fer est aisément soluble dans l'eau. Par contre, sous la forme Fe^{3+} le fer ionisé forme des complexes oxy-hydroxyde insolubles. En présence d'oxygène et à un pH proche de la neutralité le fer est globalement transformé en Fe^{3+} , devenant ainsi difficilement accessible aux bactéries. Étant donné que le fer est absolument nécessaire à la vie cellulaire de quasiment toutes les espèces bactériennes (à trois exceptions connues près : *Borrelia burgdorferi*, *Lactococcus plantarum* et *Streptococcus suis* qui remplacent le fer par le manganèse et le cuivre), les diverses espèces de bactéries nécessitent des systèmes efficaces pour l'acquisition de fer (12). Cette nécessité est encore plus élevée en ce qui concerne les bactéries pathogènes, car dans l'organisme hôte le fer est fortement lié par des protéines spécifiques, telles que la transferrine et la lactoferrine chez les mammifères ou encore l'ovotransferrine chez la volaille (1, 12, 77 chapitre 71, 142, 143).

Chez les diverses souches d'*E. coli* il existe plusieurs systèmes bien documentés de transport de fer de haute affinité, ainsi que d'autres d'affinité moindre. Globalement nous pouvons subdiviser les systèmes de haute affinité en deux groupes : ceux qui permettent le transport de Fe^{3+} et ceux qui transportent Fe^{2+} . Le premier groupe comprendrait les systèmes responsables de la production et la sécrétion des sidérophores, ainsi que de la récupération des complexes formés par ces sidérophores avec l'ion Fe^{3+} (10, 11, 12, 32, 119). Le second groupe comprenait jusqu'à une période récente un seul transporteur FeoAB, mais chez certaines souches d'*E. coli* pathogènes nous pouvons actuellement lui joindre le transporteur SitABCD qui est l'objet de la présente étude (1, 9, 10, 11, 12, 52, 58, 117).

Le transport du Fe^{3+} :

En ce qui concerne les systèmes dépendants des sidérophores, ils sont nommés en fonction de ces chélateurs de faible poids moléculaire qui ont une haute affinité pour l'ion

Fe^{3+} (1, 12, 32, 119). Les sidérophores produits par différents microorganismes sont très nombreux et on en compte actuellement pas moins d'une centaine (77 chapitre 71). Tous les sidérophores peuvent être globalement subdivisés en cathécholates et hydroxamates, selon leur structure chimique (12, 77 chapitre 71). Les sidérophores accomplissent trois rôles : tel que mentionné, ils permettent de solubiliser le Fe^{3+} sous forme de chélates, de plus ils permettent de récupérer le fer des protéines de l'hôte en cas d'infection et enfin ils réservent le fer à leur microorganisme producteur dans le cas de compétition d'une population hétérogène de microorganismes (12, 77 chapitre 71). Ce dernier rôle n'est rempli que partiellement car certains microorganismes possèdent des récepteurs pour des sidérophores qu'ils ne produisent pas, ce qui leur permet de s'approprier une partie plus importante de fer disponible dans une niche environnementale donnée (12,77 chapitre 71).

En ce qui concerne *E. coli*, la production de l'entérobactine (aussi appelée entérochéline) a été démontrée chez l'ensemble des souches sauvages, certaines souches pathogènes produisent l'aérobactine (généralement codée par un opéron plasmidique) et la yersiniabactine de même que la salmochéline découverte récemment, qui est une modification de l'assemblage des composantes de l'entérochéline par le système Iro (10, 11, 32, 45, 104).

E. coli produit aussi des récepteurs pour des sidérophores fongiques tels que le ferrichrome, le coprogène, et l'acide rhodotorulique qu'elle récupère dans des milieux qu'elle partage avec les microorganismes producteurs (12, 77 chapitre 71). D'autres substances, telles que le citrate, les groupements hème de même que l'acide dihydroxybenzoïque (DHB) et la dihydroxybenzoylserine (DHBS) qui sont des sous-produits de la synthèse de l'entérobactine, permettent aussi de solubiliser Fe^{3+} et sont récupérés par des systèmes récepteur-transporteur qui leurs sont dévoués (77 chapitre 71).

Le transport des sidérophores est actif et utilise le système TonB-ExbB/ExbD, trois protéines indispensables pour fournir l'énergie nécessaire au passage des complexes sidérophore-fer à travers la membrane externe. Les récepteurs de sidérophores servent aussi de portes d'entrée aux colicines et aux phages (1, 12, 77 chapitre 71).

L'entérobactine est le sidérophore principal d'*E. coli*, produit par toutes les souches de cette espèce, à l'exception de certains mutants (1, 77 chapitre 71).

Il est à noter que les souches du genre *Shigella* fort proches des *E. coli* pathogènes, sont dépourvues d'entérobactine (95). Ce sidérophore appartient au groupe de cathécolates et est le résultat de plusieurs étapes de synthèse qui partant de l'acide chorismique, aboutissent au sidérophore grâce à l'aide de six enzymes encodés par les gènes *ent*. Le processus de la synthèse de l'entérobactine est en général subdivisé en deux grandes étapes : la conversion du chorismate en DHB et la synthèse subséquente de l'entérobactine à partir de DHB et de la sérine en passant par le DHBS (12, 77 chapitre 71). De plus, les gènes *fep* responsables du transport du sidérophore et du complexe sidérophore-fer sont au nombre de cinq dont le gène encodant le récepteur FepA. Enfin, le gène *fes* est responsable de la libération du fer du complexe chélaté. Tous ces gènes appartiennent au locus situé approximativement à 13,1 min du chromosome d'*E. coli* K-12.

L'aérobactine est un sidérophore appartenant au group des hydroxamates. Il est surtout produit par des souches virulentes d'*E. coli* et plus particulièrement les souches invasives, ainsi que par d'autres entérobactéries pathogènes (*Klebsiella*, *Shigella*) et ceci explique qu'on le considère comme un facteur de virulence potentiel. L'aérobactine est synthétisée par quatre gènes *iuc* à partir de la lysine et du citrate et récupéré par le récepteur IutA. L'opéron aérobactine est le plus souvent porté par des larges plasmides de virulence de la famille pCol-V qui permettent aussi la synthèse de la colicine V, mais peut aussi être intégré dans le chromosome au niveau d'un îlot de pathogénicité chez les souches d'*E. coli* et *Shigella* (1, 6, 12, 77 chapitre 71, 112).

La yersiniabactine est aussi un sidérophore considéré entant que facteur de virulence car il fait partie de l'îlot de haute pathogénicité des espèces virulentes du genre *Yersinia* qui comporte les pathogènes responsables de la peste ainsi que d'autres pathologies importantes chez l'humain. La yersiniabactine est aussi produite par certaines souches extra-intestinales, virulentes d'*E. coli* (ExPEC). Sa synthèse implique en tout six enzymes YbtA, YbtE, YbtT, YbtU ainsi que Irp2 et Irp1. Son transport fait intervenir le récepteur Psn dans la membrane externe, ainsi qu'un transporteur de type ABC, composé de YbtS, YbtX, YbtQ et YbtP pour traverser le périplasma et la membrane periplasmique (119).

Le dernier sidérophore d'*E. coli* est de découverte récente, la salmochéline est une modification de l'assemblée des constituants de la synthèse de l'entérobactine,

plus particulièrement de la dihydroxybenzoïlsérine (DHBS), due à l'intervention de l'opéron *iro*. Bien que les mécanismes réels de la synthèse et de l'utilisation de la salmochéline soient imparfaitement connus, l'hypothèse actuelle est que la protéine IroB permet de lier deux groupements DHBS par l'intermédiaire d'un résidu glucose donnant ainsi une des deux formes possibles de la salmochéline, l'autre forme ayant un deuxième résidu glucose lié à un autre DHBS. Les deux formes de la salmochéline seraient excrétés par le biais de IroC et récupérées par le récepteur IroN. La salmochéline est produite par certaines souches virulentes d'*E. coli* et aussi par *Salmonella enterica* (45, 104).

Finalement les molécules autres que les sidérophores permettent de solubiliser l'ion ferrique et sont récupérés dans le milieu par des récepteurs spécifiques. Ainsi le complexe citrate-2[Fe³⁺] est récupéré par le récepteur FecA, qui peut aussi lier le complexe entérobactine-Fe³⁺ mais avec une affinité plus faible. Quant à DHB et DHBS, ces cathécholates peuvent aussi former des complexes avec Fe³⁺, et sont récupérés par les récepteurs Fiu, Cir et FepA mais avec une affinité basse (77 chapitre 71).

Le transport de Fe²⁺ FeoB:

Jusqu'à très récemment, un seul transporteur était connu pour les ions ferreux chez *E. coli*. Il s'agit de FeoB, le produit d'un opéron de trois gènes *feoA*, *feoB* et *yhgG* (appelé *feoC* chez *Yersinia pestis*), situé à 74,9 min du génome de la souche MG1655 d'*E. coli* K-12 (77 chapitre 71). FeoA est une petite protéine de 75 acides aminés de long, dont le rôle exact est pour l'instant non élucidé, FeoB est une protéine de 773 acides aminés et est considérée comme étant un transporteur de la membrane cytoplasmique, quant à YhgG dont la taille est de 78 acides aminés son rôle n'est pas plus connu (58, 77 chapitre 71).

FeoB présente des homologies avec des NTP-ases correspondant à un groupement « protéine-G » intramoléculaire dans sa partie N-terminale, homologue aux protéines G des cellules eucaryotes, liant le GTP (44, 120). Quatre (G1-G4) des cinq domaines conservés des protéines G ont été identifiés dans la structure moléculaire de FeoB, ce qui l'identifiait en tant que GTP-ase potentielle. En fait FeoB a démontré une activité GTP-ase qui semble indispensable au transport de Fe²⁺ (44).

Le transport de fer par FeoB, à la différence de celui des sidérophores apparaît comme étant TonB indépendant. Le mécanisme exact de transport de Fe²⁺ par FeoB

n'est pas encore tout à fait déterminé, une des hypothèses avancées est que FeoB lie l'ion Fe^{2+} en même temps que le GTP et que le transport implique des changements conformationnels, l'énergie des quels est fournie par l'hydrolyse du GTP en GDP (120). FeoA et FeoC joueraient dans ce modèle le rôle de protéines régulatrices de l'entrée du fer dans le cytoplasme, bien que ces protéines ne soient pas aussi conservées que FeoB chez les différentes espèces bactériennes(44, 58, 120).

Des protéines de forte similitude à FeoB sont très conservées chez les eubactéries, mais aussi chez les archéobactéries et les eucaryotes. Il est possible que FeoB soit en fait une forme archaïque des protéines-G apparue quant l'oxygène atmosphérique était encore rare et le fer ferreux abondant (44). Quoiqu'il en soit, l'opéron *feo* est régulé par le régulateur du transport de fer Fur, mais aussi par le régulateur de l'anaérobiose FNR (44). De plus, FeoB semble important lors de colonisation de sites anatomiques anaérobies, tels que l'intestin car les mutants *feoB* de *S. typhimurium* sont affectés dans leur capacité de proliférer dans ce site (121). Enfin, le gène *feoB* de *S. flexneri* fait partie de ceux qui sont activés à l'intérieur de la cellule eucaryote de l'hôte (97). Ces deux dernières caractéristiques en font un facteur de virulence potentiel (97, 121).

Le stockage du fer :

Étant donné que le fer peut être impliqué dans la réaction de Fenton et contribuer à générer des radicaux libres d'oxygène, sa quantité et son état dans la cellule sont étroitement contrôlés (1, 12, 77 chapitre 71, 108). D'un côté l'entrée du fer dans la cellule est régulée par Fur, d'un autre le fer dans la cellule n'est jamais sous forme libre, mais est lié (1, 12, 70, 77 chapitre 71, 108).

Nous aborderons la question de la régulation dans un paragraphe ultérieur, pour l'instant consacrons-nous à la mise en réserve du fer acquis par la cellule. Le fer intracellulaire est lié, soit dans les sites catalytiques des enzymes dont il est le cofacteur, soit dans les groupements hème, soit encore dans les protéines de stockage. *E. coli* possède deux de ces protéines : la ferritine (FTN) et la bactérioferritine (BFR) (1,77 chapitre 71). Ces protéines ont pour homologues les ferritines eucaryotes (77 chapitre 71). Chez *E. coli* K-12 le gène *bfr* se trouve à la position 3463150 à proximité du gène *yheAp* qui est une ferroxidase associée à la bactérioferritine. Le gène *fntA* est situé à la position 1986003 du chromosome d'*E. coli* K-12. Quant aux protéines elles-mêmes ce

sont des multimères de forme sphérique, formés de 24 sous-unités qui dans leur cavité centrale peuvent contenir des milliers (2000-3000) d'ions ferriques (1). BFR est associée à des groupements hème d'où son ancienne appellation de cytochrome b1 (1, 77 chapitre 71). La ferroxidase YheAp associée aux bactérioferritines permet l'oxydation de Fe^{2+} , la forme sous laquelle le fer entre dans la cellule, en Fe^{3+} qui sera mis en réserve à l'intérieur des ferritines. Il faut remarquer que l'affinité de BFR et FTN vis à vis des ions ferriques est différente, ce qui laisse présager une différence dans leurs capacités de stockage (1, 77 chap.71). En effet BFR capte le fer plus avidement que FTN, ce qui permet d'avancer l'hypothèse selon laquelle FTN sert au stockage transitoire, alors que BFR servirait à un remisage du fer à long terme (1, 77 chap.71). Cette hypothèse semble soutenue par le fait que BFR est surtout synthétisée lors des périodes de croissance lente, dont la phase stationnaire, alors que la synthèse de FTN ne varie pas dans le temps. De plus la ferroxidase associée à FTN est plus active ce qui permet de lier le fer plus rapidement. Enfin in vitro FTN est plus instable et finit par être dégradée par les radicaux libres dont l'apparition semble être due à la présence des ions de fer qui servent de catalyseur à la réaction de Fenton (1, 77 chap. 95). Quoi qu'il en soit les mutants *ftnA* ont des défauts de croissance en milieu pauvre en fer et n'accumulent pas de fer pendant la phase de croissance exponentielle en milieu riche.

Un autre groupe de protéines capables de lier le fer sont les protéines de détoxification du fer (Dps), des multimères de 12 sous-unités qui lient aussi le fer ferrique (env. 500) oxydé à partir du fer ferreux par le H_2O_2 , tout en se liant à l'ADN qu'elles protègent ainsi du stress oxydatif. Ces protéines sont surtout synthétisées en phase stationnaire grâce à l'intervention du facteur de transcription alternatif δ^s (RpoS) (1).

En terminant, il faut noter que l'étude de ségrégation et des flux du fer intracellulaire apparaît actuellement assez ardue et que les connaissances actuelles sur l'état du fer à l'intérieur de la cellule sont fragmentaires (122).

Contrôle du métabolisme du fer :

Il est certain que l'élément le plus important du contrôle du métabolisme du fer chez *E. coli* est la protéine Fur (pour ferric uptake repressor) qui contrôle environ 90 gènes différents en adaptant leur expression à la disponibilité du fer, bien que le métabolisme du fer dépasse l'action de ce régulateur global.(1, 70, 77 chap. 71)

Fur est un homodimère formé de deux sous-unités identiques de 17 kDa. Chaque unité lie un ion Fe^{2+} , ce qui permet la liaison du régulateur à l'ADN en augmentant son affinité d'un facteur de 1000. En outre, chacune des sous-unités contient un atome de zinc qui n'est cependant pas impliqué dans la liaison de Fur à l'ADN et dont le rôle est actuellement mal compris, surtout que le site qui contient l'atome de zinc n'est pas conservé chez les homologues de Fur présents chez les autres espèces bactériennes (1, 77 chapitre 71).

Dans la majorité des cas, Fur agit tant que répresseur positif, dépendant de Fe^{2+} qui est donc son corépresseur, de la transcription des gènes de son régulon. Fur se lie à une séquence d'ADN spécifique (Fur-box ou iron-box) qui se trouve en général à la position 10-35 du promoteur des gènes du régulon Fur. La séquence consensus du Fur-box est $GATAATGAT(A/T)ATCATTATC$, bien que cette séquence consensus ne se retrouve nulle part dans son intégralité au sein du génome d'*E. coli*. En effet, une homologie de 11 bases sur 19 suffit à la liaison de Fur. En fait d'autres études plus récentes semblent démontrer que Fur se lie à un motif conservé $NAT(A/T)ATNAT(A/T)ATNAT(A/T)ATN$ qui peut donc prendre des formes diversifiées (1). De plus il semblerait que plus d'un dimère Fur peut se fixer sur un Fur-box si le motif consensus de hexaséquences est répété, dans ce cas la liaison d'un premier dimère entraînerait l'association des autres dimères en cascade, l'amas total des régulateurs débordant ainsi de leur site de liaison spécifique (124). Il est à noter que les dimères Fur se fixent dans ce cas sur les deux brins de l'ADN, en enveloppant celui-ci (1). Enfin, il existe des cas exceptionnels dans lesquelles Fur exerce un contrôle positif sur l'expression des gènes régulés, dans ce cas où Fur n'agit plus tant que répresseur, aucune séquence consensus de liaison ne fut trouvée dans le promoteur des gènes concernés et le mécanisme exact de la liaison de Fur n'est pas encore bien compris, mais on pense qu'il pourrait impliquer un petit ARN spécifique (123).

La quantité totale des protéines Fur dans une cellule d'*E. coli* est très élevée, de 5000 en phase exponentielle de croissance et atteignant 10000 protéines par cellule en phase stationnaire. Une des explications possibles de cette abondance des protéines Fur, serait que celles-ci serviraient de « tampon », absorbant les variations de la quantité de fer intracellulaire en liant les ions Fe^{2+} qui sont la forme physiologiquement active de fer. En

effet, l'affinité de Fur pour Fe^{2+} est $\approx 10 \mu M$, ce qui correspond à la concentration moyenne intracellulaire de Fe^{2+} (1).

L'expression du gène *fur* est sous le contrôle positif des régulateurs de la réponse au stress oxydatif : SoxR/SoxS (superoxyde) et OxyR (peroxyde). Le gène *fur* fait partie d'un opéron avec le gène *fldA* encodant une flavodoxine qui serait responsable de la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} fournissant ainsi les cofacteurs au régulateur Fur. Le site de liaison de SoxR est dans le promoteur commun de l'opéron, alors que le site de liaison de OxyR est en amont du gène *fur* et donc particulier de ce dernier. Il est donc clair que Fur intervient en tant qu'élément du schéma de régulation qui lie le fer au stress oxydatif. Enfin, *fur* subit un autocontrôle négatif par l'intermédiaire d'un Fur-box partiellement conservé dans la région intergénique *fldA-fur* (1).

Le rôle de Fur déborde le contrôle de fer, car outre les gènes directement impliqués dans l'acquisition et la gestion du fer (35 au total chez *E. coli* K-12), d'autres gènes parmi les 90 régulés par Fur chez *E. coli* K-12 remplissent des rôles diversifiés. Ainsi, des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, la respiration, la défense contre le stress oxydatif, la chimotaxie et la synthèse des flagelles et adhésines contiennent aussi des séquences Fur-box dans leurs promoteurs. Aussi, les mutants *fur* d'*E. coli*, sont incapables de croître sur des sources de carbone non fermentables ce qui implique un défaut de la respiration cellulaire et sont plus susceptibles au stress oxydatif ainsi qu'à la toxicité induite par le fer (1).

La régulation du métabolisme de fer souligne à quel point cet élément est vital pour la vie bactérienne.

Importance du manganèse dans le métabolisme bactérien :

Bien que le manganèse soit reconnu comme étant un oligo-élément essentiel, dont la présence à l'état de traces est indispensable à la croissance bactérienne, c'est seulement lors de la dernière décennie que les multiples aspects de son métabolisme ont commencé à être mieux compris. En effet, encore en 1996, le pionnier du transport bactérien des métaux, Simon Silver pouvait se permettre d'affirmer que « Le transporteur présumé de Mn^{2+} chez *E. coli* n'a pas été identifié. Nous avons, avec mes collaborateurs, résumé la littérature concernant le transport du manganèse en 1987 et aucun travail sur le transport de Mn^{2+} chez *E. coli* n'a été reporté depuis plusieurs années (77 chapitre 72,102,103).

Cependant en moins de dix ans les choses ont grandement changé. Des transporteurs de manganèse ont été décrits chez les procaryotes, mais aussi chez les eucaryotes. La régulation du transport de manganèse est de mieux en mieux comprise et des régulateurs spécifiques ont été définis chez plusieurs espèces.

Les enzymes, nécessitant du Mn^{2+} tant que co-facteur, sont de plus en plus nombreuses à être connues. Le manganèse a été fermement identifié comme étant un élément important de la défense contre le stress oxydatif. Des concentrations intracellulaires de Mn^{2+} , de l'ordre du mM ont été observées chez différentes espèces. Enfin, des bactéries qui ne nécessitent pas de fer et remplacent ce dernier par le manganèse ont été découvertes (2, 48,50,62). Le manganèse apparaît donc de plus en plus tant qu'élément fondamental du métabolisme bactérien et aussi de même que le fer, semble être impliqué dans la virulence des bactéries pathogènes (3, 9, 48).

Le transporteur du manganèse, MntH:

Dés les années 1960 Silver et son group ont démontré, avec ses collègues, l'existence chez *E. coli* d'un transport spécifique et actif de Mn^{2+} (102, 103). Néanmoins, c'est chez les eucaryotes que le premier transporteur connu de Mn^{2+} a été identifié. En effet, en 1996, le locus *bcg/lsh/ity*, responsable de la résistance naturelle aux pathogènes intracellulaires, a été démontré comme étant à l'origine d'un transporteur de cations des métaux de transition nommé NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) (69). Deux types de transporteurs NRAMP : NRAMP-1 et NRAMP-2 ont été définis. Par la suite, de nombreux homologues bactériens de NRAMP ont été décrits.

Mn^{2+} est apparu comme étant le substrat majeur de ces transporteurs chez les espèces aussi diverses que *E. coli*, *S. enterica* serovar Typhimurium, et *Bacillus subtilis* (16, 62, 63). Chez les entérobactéries le gène *yfeP*, a été identifié comme étant à l'origine d'un transporteur de manganèse homologue à NRAMP-2 qui transportait le Mn^{2+} . Par conséquent, il fût renommé *mntH*, en accord avec la nomenclature proposée pour les transporteurs de manganèse par Hellmann (62, 63, 69). De même que NRAMP-2, MntH est actuellement vu comme étant un symporteur de manganèse et protons, énergisé par le potentiel de membrane, dû au gradient de concentration des protons de part et d'autre de celle-ci. Quant à NRAMP-1, transporteur eucaryote qui est un facteur de résistance à l'infection intracellulaire associé à la membrane du phagosome des macrophages, il

transporte Mn^{2+} et Fe^{2+} , en agissant tant que pompe qui exporte les cations à l'extérieur du phagosome, privant ainsi les pathogènes des éléments indispensables à la survie bactérienne (9, 62, 63, 69).

Étant donné la présence de MntH chez des pathogènes intracellulaires, dont *S. typhimurium*, la présence de NRAMP-1 chez les phagocytes de l'hôte et l'homologie entre MntH et NRAMP-2, l'hypothèse la plus séduisante les concernant, est que les deux transporteurs sont en compétition pour les cations à l'intérieur du phagosome (9, 69). Ainsi, ces deux transporteurs homologues seraient directement impliqués dans un des aspects de l'interaction hôte-pathogène, déterminant pour l'issue de l'infection. De plus, étant donné que Mn^{2+} est le principal substrat transporté par MntH et NRAMP-1 et 2, il apparaît que le manganèse est d'une grande importance pour la pathogénie (69). Néanmoins, il est à noter que les homologues de MntH sont présents non seulement chez les pathogènes intracellulaires mais aussi chez les bactéries non-pathogéniques, ainsi que chez les pathogènes qui n'ont pas de stade intracellulaire d'infection (2). MntH est donc un transporteur de manganèse qui est un facteur de virulence potentiel, mais qui est avant tout d'une considérable importance pour le métabolisme bactérien à l'intérieur comme à l'extérieur d'un organisme hôte. De plus, les souches mutantes *mntH* de *S. typhimurium* n'étaient que partiellement atténuées lors de l'infection des souris dans un modèle expérimental et ne perdaient pas totalement la capacité de transporter le Mn^{2+} (9). Il en résultait que MntH n'était probablement pas le seul transporteur de Mn^{2+} chez *S. typhimurium*.

L'identification des transporteurs de type ABC capables de transporter le Mn^{2+} : MntABC chez *Synechocystis sp.* et YfeABCD chez *Yersinia pestis* et, deux microorganismes possédant des homologues de NRAMP : YfeP et MntH respectivement, a conduit à rechercher un transporteur apparenté chez *S. typhimurium* (2, 3, 5). Ce transporteur s'est avéré être SitABCD (*S. typhimurium* iron transporter), préalablement considéré comme un transporteur spécifique de Fe^{2+} (117, 61, 9).

Le transporteur du manganèse, SitABCD:

SitABCD appartient à une large famille de transporteurs, les perméases ABC (ATP Binding Cassette) dépendantes d'une protéine de liaison périplasmique PBP (Periplasmic Binding Protein) et spécialisées dans le transport des ions métalliques (20).

L'ensemble des opérons codant pour les transporteurs ABC chez *E. coli* K-12 (en tout 57 systèmes différents) est la plus grande famille paralogue de gènes chez cette espèce bactérienne occupant près de 5% du génome. Parmi ceux-ci 44 transporteurs sont dépendants des PBP. Tous ces transporteurs peuvent être subdivisés en dix familles distinctes par analyse bio-informatique (125).

Parmi les transporteurs dont le rôle est connu, plusieurs interviennent dans le transport des ions métalliques. Ainsi le transport du fer, groupement hème et sidérophores est assuré par : FecE, FepC et FhuC. Le molybdène est importé par ModC associé à ModF. Le nickel est importé par NikE (125). Le zinc est importé par une protéine conservée, homologue à ZnuA de *S. typhimurium* (encodé par les gènes *b1857* chez K-12 ou *yebL* chez CFT073). Enfin, de nombreux transporteurs ABC d' *E. coli* n'ont pour l'instant pas de rôle défini, ce qui laisse espérer que d'autres transporteurs de métaux seraient encore identifiés au sein de cette famille (20).

Il est à noter que des transporteurs ABC additionnels peuvent être présents chez les souches pathogènes d'*E. coli*, tels le système Hly permettant l'export de l'hémolysine, les systèmes de transport de la colicine-V ainsi que les systèmes de l'export des composantes de la capsule etc. (77 chapitre 76). De plus, il existe nombreux autres transporteurs ABC chez les souches pathogènes d'*E. coli* dont le rôle reste encore à préciser et qui pourraient s'avérer des potentiels facteurs de virulence. Ainsi, en ce qui concerne la souche d'*E. coli* uropathogène CFT073, l'opéron *sitABCD* est compris entre la position 1450000 et 1446700 environ, alors que chez *E. coli* K-12 MG1655 il n'y a dans la région correspondante du chromosome, rien de semblable, de même l'opéron *sitABCD* est présent chez *S. flexneri* et *S. typhimurium* mais absent chez la souche entéro-hémorragique *E. coli* O157 :H7 EDL933 (114).

SitABCD appartient à la famille de *YfeABCD*, un transporteur de fer et manganèse de *Yersinia pestis* (3,4). Le premier membre décrit de cette famille fût *MntABC*, découvert par Bartsevitch et Pakrasi en 1996 chez *Synechosystis sp*, ce fût la première description d'un transporteur ABC spécifique du manganèse (2).

En 1998 Bearden, Staggs et Perry annoncèrent la découverte chez *Y. pestis* de *YfeABCD*, qu'ils considérèrent initialement comme étant un transporteur de fer, avant de démontrer en 1999 qu'il s'agit en fait d'un transporteur de Fe^{2+} et Mn^{2+} (3,4).

C'est aussi en 1999 que SitABCD est décrit pour la première fois chez *S. typhimurium* par Zhou et Galan. Ils considèrent SitABCD comme étant un transporteur de fer chélaté (117).

En 2000 Janakiraman et Slauch démontrèrent que SitABCD intervient dans la virulence de *S. typhimurium*, puis en 2002 un collectif comprenant ces deux chercheurs démontrèrent que SitABCD est avant tout un transporteur alcalin de Mn^{2+} , bien qu'il ait aussi une affinité moins élevée pour des ions divalents tels que Fe^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} (52, 61).

C'est en 2000 aussi que Boyer et collaborateurs montrèrent que SitABCD et MntH sont ensemble responsables de la majeure partie du transport de Mn^{2+} , alors que SitABCD et FeoB sont importants pour l'influx de Fe^{2+} , de plus ils confirmèrent l'importance de SitABCD pour la virulence chez *S. typhimurium* et lièrent SitABCD à la résistance aux effets toxiques de H_2O_2 (9).

En 2002 Runyen-Janecky et Payne ont démontré que SitABCD de *S. flexneri* est exprimé à l'intérieur des cellules eucaryotes en culture, puis en 2003 il s démontrent que SitABCD est impliqué dans le transport de Fe^{2+} in vivo de même qu'in vitro (97, 126).

Au sein de notre laboratoire, l'étude de SitABCD a débuté en 2002 suite à la communication personnelle faite par Maryvonne Moulin-Schouleur, dont l'équipe à l'INRA de Tours en France a identifié plusieurs séquences pathospécifiques de la souche APEC MT512 (O2 :K1) d'*E. coli* par la technique de l'hybridation génomique soustractive (23). Parmi celles-ci une séquence partielle d'environ 500 pb. était fortement homologue à *sitA* de *S. typhimurium* par les algorithmes BlastX BlastP et BlastN . En collaboration avec Maryvonne Moulin-Schouleur nous avons donc utilisé cette séquence pour faire une recherche dans les bases de données de séquences génétiques disponibles sur Internet, afin de confirmer la présence d'un opéron *sitABCD* chez *E. coli* CFT073 et *S. flexneri* avant la publication de ces génomes (113, 114).

Comparaison de SitABCD et MntH:

Dans cette section nous allons présenter les informations relatives aux deux transporteurs SitABCD et MntH basées sur les résultats des travaux cités dans la section précédente.

Les deux transporteurs sont totalement différents sur le plan structurel. SitABCD est un transporteur ABC dans lequel SitA est une protéine périplasmique captant les cations tels que Mn^{2+} ou encore Fe^{2+} pour les transférer à la perméase formée par SitC et SitD, qui à l'aide de l'énergie fournie par les deux domaines ATPase de SitB, permet le passage du cation de l'espace périplasmique vers le cytoplasme. On peut donc y distinguer trois composantes fonctionnelles : la protéine de liaison périplasmique, la perméase transmembranaire et les ATP-ases associées. MntH est quant à lui, une pompe symporteur formée d'une protéine transmembranaire unique (61, 62). La source d'énergie pour le transport actif par SitABCD est l'ATP. Quant à MntH, il dépend de la force proton-motrice et est énergisé par le flux des protons dans le sens du transport des cations (61, 62, 63).

Chez *S. typhimurium* l'affinité des deux transporteurs pour Mn^{2+} est fortement semblable : $K_a \approx 0,1 \mu M$ (61, 62). Les constantes d'inhibition du transport de manganèse étant pour Fe^{2+} : $K_i \approx 3-10 \mu M$, pour Cd^{2+} : $K_i \approx 1 \mu M$ et pour Co^{2+} : $20 \mu M$. Par contre d'autres cations sont des inhibiteurs très faibles de transport de Mn^{2+} : Ni^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{3+} ont une constante d'inhibition $K_i > 100 \mu M$ pour les deux transporteurs. La seule différence notable dans l'affinité entre les deux transporteurs est due à Zn^{2+} qui est transporté par SitABCD avec une affinité assez élevée : $K_i \approx 1-3 \mu M$, alors que le transport de manganèse par MntH n'est que peu inhibé $K_i > 50 \mu M$ (61). Le profil d'affinité des deux transporteurs pour les cations semble donc être très semblable chez *S. typhimurium* et cela malgré les différences de leurs structures et mécanismes de transport respectifs. Il est à noter que le transport de Fe^{2+} par MntH, bien que théoriquement possible ne semble pas être significatif dans les cellules bactériennes (61, 62, 63).

Par contre en ce qui concerne la dépendance du pH, elle est opposée pour les deux transporteurs. Alors que MntH est plus efficace à un pH acide, SitABCD est plus performant à pH alcalin. Ainsi leur profil de dépendance au pH est complémentaire, suggérant qu'ils aient leur utilité maximale dans des sites niches environnementales différentes (61).

En ce qui concerne leur régulation, les deux transporteurs de *S. typhimurium* sont dépendants des régulateurs Fur et MntR et cela même si leur affinité pour le Fe^{2+} semble bien plus faible que les concentrations habituellement observées in vivo.

radicaux libres. On considère actuellement que la majorité du manganèse intracellulaire serait sous forme de complexes d'anions, tels que les phosphates ou les bicarbonates, solubles dans le cytoplasme. De plus, le manganèse serait contenu dans les sites catalytiques des enzymes dont il est le cofacteur. Il semble aussi probable que le Mn^{2+} pourrait former des complexes non-spécifiques avec des protéines cytoplasmiques, dont il assurerait ainsi la protection contre les effets du stress oxydatif. Enfin, la concentration du manganèse intracellulaire peut-être ajustée par un hypothétique système d'export à partir du cytoplasme, dont le transporteur le plus probable est YbiR, encodé chez *E. coli* par le gène *ybiR*, dont le plus proche homologue est un exportateur d'arséniate As^{2+} chez *M. tuberculosis*.(62)

Manganèse tant que cofacteur enzymatique :

Mn^{2+} est le cofacteur de nombreuses enzymes qui interviennent dans divers aspects du métabolisme bactérien. La liste complète des enzymes associées au Mn^{2+} dépasserait le cadre de notre étude. Nous allons néanmoins en citer certaines pour souligner l'hétérogénéité des mécanismes catalysés avec l'intervention du Mn^{2+} . Parmi celles-ci les protéine-phosphatases PrpA et PrpB, les aminopeptidases PepP et PepQ, les lipide-phosphotransférases, les ribonucléotide-réductases NrdAB et NrdEF et enfin les polysaccharide-synthétases. D'autres enzymes interviennent dans le catabolisme des sucres, dont la phosphoglycéromutase GpmM et la fructose-1,6-diphosphatase GlpX. Enfin, les enzymes qui présentent le plus d'intérêt dans le cadre de notre étude sont sans doute celles qui interviennent dans la défense de la cellule bactérienne contre le stress oxydatif dont la superoxyde dismutase SodA et la catalase non-hème KatN (62).

Manganèse, fer et stress oxydatif :

Les bactéries aérobies et aérobies facultatives, sont constamment sous la menace des produits toxiques de la transformation de l'oxygène. En effet, l'oxygène peut être réduit en superoxyde O_2^- et peroxyde d'hydrogène H_2O_2 . Le superoxyde O_2^- peut être transformé rapidement en H_2O_2 sous l'effet des superoxyde dismutases (Sod) dont le cofacteur peut-être le Mn^{2+} (*sodA*), le Fe^{2+} (*sodB*) ou encore le Zn^{2+} chez les eucaryotes et le Zn/Cu dans le cas de certains procaryotes dont certaines souches d'*E. coli*. Le peroxyde H_2O_2 est décomposé en H_2O par la catalase (*kat*) dont le cofacteur peut être le

Fe^{2+} (*katG* et *katE*) ou le Mn^{2+} chez *S. typhimurium*, *Klebsiella* et *Serratia* (la catalase non-hème KatN), mais peut aussi se transformer en radical hydroxyl HO^{\cdot} extrêmement toxique, contre lequel aucune protection enzymatique n'est connue à ce jour (62, 77 chapitre 95).

La réponse au stress oxydatif est sous le contrôle du système senseur-régulateur SoxR-SoxS, induits par le superoxyde, et régulateur OxyR qui répond au peroxyde. Parmi les nombreux gènes contrôlés par ces régulateurs il y a des gènes impliqués dans le métabolisme de fer, dont le régulateur global du transport Fur qui régule SitABCD, mais aussi MntH qui de plus, est chez *S. typhimurium* directement régulé par OxyR (62, 77 chapitre 95).

Quand on prend en considération le fait que le fer puisse être impliqué dans la réaction de Fenton qui accélère l'apparition des dérivés toxiques d'oxygène [$\text{Fe(II)} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe(III)} + \text{OH}^- + \text{OH}^{\cdot}$], ainsi que le fait que le Fe^{2+} fasse partie du site catalytique de SodB, KatG, KatE et DPS, l'importance du contrôle du métabolisme de cet élément apparaît évidente.

En ce qui regarde le Mn^{2+} , celui-ci se retrouve dans les sites catalytiques de SodA ainsi que KatN chez certaines entérobactéries (48, 62). De plus des études récentes chez *Neisseria gonorrhoeae* ont démontré qu'à des concentrations intracellulaires élevées Mn^{2+} était capable de détoxiquer le superoxyde indépendamment de SodA (48, 127). Des concentrations de l'ordre du mM ont aussi été récemment décrites chez les entérobactéries (62). Il serait donc possible que le manganèse y joue un rôle semblable à celui joué chez *Neisseria*. En effet, les bases de la détoxification non-enzymatique du superoxyde par les complexes de Mn^{2+} ont été publiées dès 1982 par Fridovich et collaborateurs et en 1990 l'équipe de Stadtman définit le mécanisme de base de la déprotonation non-enzymatique du peroxyde d'hydrogène par le Mn^{2+} en tampon de bicarbonate (128, 129). De plus, il a été récemment démontré in vitro, que des complexes de Mn^{2+} avec des Salens, dérivés synthétiques de N,N'-di(salicylidene)-éthylènediamine chloride, sous la forme oxo, sont capables de transformer l'oxyde nitreux NO en oxyde nitrique NO_2 , moins toxique, et les nitrites NO_2^- en nitrates NO_3^- , moins réactifs (130).

Bien que les complexes Salens- Mn^{2+} soient des produits artificiels, il est possible que le Mn^{2+} complexé par des composés bactériens spécifiques (tels que les métalloprotéines), puisse avoir des propriétés catalytiques particulières. Surtout que les

complexes de Salens ont récemment été utilisés afin de diminuer les conséquences de la réponse immunitaire induite chez le rat par l'endotoxine (lipide A) d'*E. coli* (131).

Quoi qu'il en soit, le manganèse est un élément de première importance dans la protection des bactéries contre les radicaux toxiques et peut être d'une importance vitale pour un pathogène se protégeant du stress oxydatif du à l'action des défenses immunitaires de l'hôte.

Redondance des systèmes de transport de Fe^{2+} et de Mn^{2+} :

Étant donné l'importance du Fe^{2+} et du Mn^{2+} dans les différents aspects du métabolisme, on ne sera pas étonné de constater que chacun des deux ions est transporté par au moins deux transporteurs spécifiques. Ainsi chez *S. typhimurium* FeoABC et SitABCD transportent Fe^{2+} alors que MntH et SitABCD transportent le Mn^{2+} . Le rôle de SitABCD apparaît d'autant plus important qu'il soit capable de transporter les deux cations (1, 62).

Régulation du métabolisme du fer, du manganèse et la réponse au stress oxydatif :

Nous avons déjà mentionné que le régulateur global du métabolisme du fer, Fur, est régulé de façon positive conjointement par SoxRS et OxyR. Nous savons aussi que Fur et MntR interviennent conjointement dans la régulation du transport de Mn^{2+} au niveau de SitABCD et MntH. Enfin nous avons précisé antérieurement l'importance de Fe^{2+} et Mn^{2+} en ce qui concerne le stress oxydatif ainsi que la sensibilité accrue des mutants *sitABCD* et *mntH* à l'action du peroxyde. Il est donc clair que SitABCD est un système important dans la gestion du dit stress et de ses conséquences (1,62).

Expression in vivo des transporteurs de Fe^{2+} et Mn^{2+} :

L'expression intracellulaire et l'importance de FeoB et SitABCD a été démontrée chez *S. flexneri*. Les mutants *feoB*, *sitABCD* de *S. flexneri* ont été moins aptes à former des plaques de lyse en culture cellulaire (126). De plus, les mutants *sitABCD* ont été partiellement atténués chez *S. typhimurium* et il en va de même pour les mutants *mntH* (9, 52).

V Conclusion de la revue de littérature :

SitABCD de *S. typhimurium* et de *Shigella flexneri* 2a, de même que YfeABCD de *Yersinia*, semblent être des éléments importants dans le transport du fer et du manganèse. De plus, SitABCD de *S. typhimurium* est lié à la résistance au stress oxydatif. Enfin, chez *S. flexneri* SitABCD est exprimé lors de l'invasion des cellules eucaryotes et chez *S. typhimurium* impliqué dans le processus infectieux. Tout ceci en fait un facteur de virulence probable.

Sachant que l'espèce *E. coli* est très proche des pathogènes cités plus haut et qu'elle possède de nombreuses souches virulentes qui causent des infections diversifiées, il nous est apparu important de caractériser *sitABCD* en tant qu'opéron et SitABCD en tant que transporteur. Cette étude se fait dans le but d'apporter des connaissances sur un facteur de virulence probable et de contribuer à une meilleure compréhension des interactions hôte-pathogène, menant ainsi potentiellement à l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques dans la lutte antibactérienne. Nous avons donc décidé de nous intéresser aux points énumérés ci-dessous.

La séquence génétique de l'opéron *sitABCD* et sa localisation, la capacité de transporter le fer et plus précisément de Fe^{2+} , le transport de Mn^{2+} , la résistance au stress oxydatif, la distribution de l'opéron au sein de la population des diverses souches d'*E. coli* et l'implication de SitABCD dans l'infection par une souche APEC dans un modèle d'infection aviaire.

VI Procédures expérimentales :

Souches bactériennes, plasmides et conditions de croissance:

Souches : Les souches d'*E. coli* du type sauvage ou mutantes sont citées dans le Tableau 1. Les souches utilisées pour l'étude de la prévalence de *sitABCD* sont décrites dans un paragraphe ultérieur. Lors du clonage des plasmides, leur propagation et leur extraction la souche utilisée de routine fut DH5 α .

Cosmides : Au sein de la banque cosmétique de la souche χ 7122, nous avons identifié par PCR deux cosmides contenant l'opéron *sitABCD*. Ces cosmides sont cités avec les plasmides dans le Tableau 2.

Plasmides : Les plasmides obtenus par clonage moléculaire des fragments choisis d'ADN dans les vecteurs plasmidiques appropriés, ainsi que les vecteurs eux-mêmes sont cités dans le Tableau 2.

Conditions de croissance : Les différentes souches utilisées ont été stockées à une température de -70° C dans le milieu Luria-Bertani (LB) (10 g d'extrait de levure, 5 g de tryptone, et 10 g de NaCl par litre) supplémenté avec 25% de glycérol. Les différentes souches utilisées ont été cultivées sur LB gélose (1,5% d'agarose) ou LB bouillon à 37° C, d'autres milieux utilisés lors des expériences spécifiques sont décrits dans les paragraphes qui suivent. Les antibiotiques ont été, si nécessaire, ajoutés aux milieux aux conditions suivantes : ampicilline $100-200 \mu\text{g ml}^{-1}$, kanamycine $30 \mu\text{g ml}^{-1}$, chloramphénicol $30 \mu\text{g ml}^{-1}$, acide nalidixique $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ et tétracycline $10 \mu\text{g ml}^{-1}$.

Manipulations de l'ADN :

Extraction de l'ADN : La purification des plasmides, des cosmides, des fragments de restriction et des amplicons, s'est faite en utilisant les kits QIAGEN[®] appropriés selon les recommandations du fournisseur. Pour l'hybridation par transfert Southern l'ADN génomique a été purifié selon un protocole standard et les grands plasmides selon la technique de Kado et Liu.(57, 99)

Enzymes de restriction et de modification : Les enzymes de restriction et de modification proviennent de NEB[®] (New England Biolabs) ou Invitrogen[®] et ont été utilisées en accord avec les recommandations des fournisseurs.

PCR : Pour l'amplification par PCR des fragments cibles d'AND, nous avons utilisé les amorces citées dans le Tableau 3. La majorité des amorces a été synthétisée par IDT[®] (Integrated DNA Technologies), certaines ont été synthétisées par le laboratoire de F. Shareck à l'INRS-IAF. L'appareil utilisé lors des amplifications a été un Eppendorf[®] Mastercycler Gradient Thermocycler . Nous avons utilisé la Taq ADN-polymérase de NEB[®] pour les amplifications de routine des fragments de moins de 2000 kb, l'Elongase de Invitrogen[®] a été utilisée pour des fragments plus longs et des amplifications à plus haute fidélité. Le mélange de réaction pour les PCR de routine, d'un volume final de

25 µl, contenait 5 µl de lysat bactérien obtenu par une ébullition rapide ou une lyse alcaline, 6,25 pmol de chaque amorce, 5 pmol de chaque dNTP et 0,5 U de la Taq. Les conditions générales d'amplification furent les suivantes :

Pour commencer 3 min à 94°C pour la dénaturation initiale (hot-start) de l'ADN cible

Ensuite 25 cycles d'étapes suivantes :

1 min à 94°C pour la dénaturation de l'ADN cible

1 min à température variable (voir Tableau 3) pour l'hybridation des amorces

1 min à 72°C élongation

Pour terminer 10 minutes d'élongation finale à 72°C

Hybridation : Pour l'hybridation par transfert Southern, les échantillons d'ADN à analyser, extraits plasmidiques ou fragments de restriction, ont été transférés sur des membranes de nylon après extraction, purification et séparation sur gel d'agarose (99). Une sonde d'ADN, correspondant à un fragment de *sitA*, amplifié par PCR, a été marquée grâce à la trousse de marquage à la digoxigénine (DIG) fourni par Roche® Diagnostics. L'hybridation de la sonde *sitA* ADN a été réalisée selon les instructions du fournisseur de la trousse. La température d'hybridation fut 54°C.

VI-3 Production des sidérophores et croissance en milieu pauvre en fer :

CAS-Agar et détection des sidérophores : Le test de production des sidérophores en présence de chrome-azurol (CAS) a été réalisé après inoculation du milieu CAS-agar par les souches à analyser. Le milieu a été préparé tel que décrit par Shwynn et Neilands (100).

Milieu liquide utilisé lors de la croissance en un milieu appauvri en fer: pour les tests de croissance en milieu pauvre en fer, nous avons utilisé le bouillon NB (Nutrient broth) supplémenté par 0,5% de NaCl, tel que décrit par Gong et collaborateurs (33), ainsi que par la thiamine, l'histidine et l'ensemble des acides aminés aromatiques, ajoutés aux concentrations usuelles. Les antibiotiques ont été ajoutés si nécessaire. Tous les milieux et réactifs étaient préparés dans des contenants de polypropylène rincés avec de l'eau désionisée, afin de minimiser la contamination en fer.

Chélateur utilisé lors de la croissance en milieu pauvre en fer: Le 2, 2'-dipyridyl (Dip) a été utilisé à une concentration finale de 60-80 µM a été préparé à une

concentration 1000X dans l'alcool éthylique, puis ajouté au milieu à un volume de 1µl/ml 1h avant l'ensemencement par les souches à tester.

Le test de croissance en milieu appauvri en fer : Les cultures de départ utilisées pour ensemercer le milieu ont été incubées dans des tubes en polypropylène contenant le milieu NB, à 37°C, durant 16-18h avec une agitation modérée (200-250 rpm). Des aliquotes de 4 ml de chaque souche ont été prélevés et traités par du Dip durant 1 heure. Les aliquotes ont par la suite été centrifugés à 3000 x g durant 10 min. Le culot a été resuspendu dans 4 ml de NB-Dip, les populations bactériennes ont été ensemencées en triplicata à raison de 1 ml dans 14 ml de milieu NB, préalablement traité par du Dip durant une heure et préchauffé à 37°C. Les cultures étaient ajustées à une même densité optique (DO_{660nm}) d'environ 0,1. Les triplicata contenus dans des tubes Falcon® en polypropylène de 50 ml ont été incubés à 37°C avec une agitation modérée durant 10 h. Les prélèvements ont été réalisés à 1 heure d'intervalle et leurs DO_{660nm} ont été notées. Un dernier prélèvement a été fait 24 heures après le début du test. Les courbes de croissance furent tracées en prenant les moyennes pour le triplicata de chaque souche et son écart type.

Séquençage de l'ADN et analyse de la région *sitABCD* :

Insertion des transposons : Les transposons Tn5seq1, contenant en 5' et 3' une séquence identique à l'amorce universelle T7 et à l'amorce universelle SP6 ont été insérés dans le plasmide pIJ28. Ce plasmide résultait de la ligation par l'ADN-ligase T4 du fragment de restriction *Hind*III d'environ 8,2 kb, englobant la région *sitABCD* et provenant du cosmide C6 de la banque cosmidique de χ 7122, dans le vecteur pACYC184 prédigéré par *Hind*III et déphosphorylé par CIAP (Calf Alkaline Intestinal Phosphatase). La technique utilisée pour l'insertion des transposons fut décrite par Nag et collaborateurs (75).

Séquençage : Le séquençage s'est fait grâce aux amorces T7 et SP6, de plus des amorces complémentaires ont été synthétisées à partir des régions séquencées afin de compléter le séquençage. La totalité de la séquence a été séquencée par la compagnie *DNA-Landmarks*®.

Montage des contigs : Les séquences obtenues ont été assemblées en utilisant le programme gratuit *Bioedit* de l'Université des Sciences de la Caroline du Nord (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/page2.html>).

Analyse bio-informatique : Les cadres de lecture ouverts putatifs ont été définis grâce à l'application *ORF-finder* du site du Centre National pour l'information en Biotechnologie (NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). Les gènes ont été comparés à leurs homologues et identifiés grâce à l'application *BLAST* du site NCBI (NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)). L'alignement des séquences s'est fait grâce à l'application *ClustalW* de l'Institut de Bioinformatique Européen (EBI <http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>). Les arbres phylogénétiques ont été obtenus grâce à l'application *TreeTop* de l'Institut Belozersky de l'Université d'État de Moscou (MSU <http://www.genebee.msu.su/genebee.html>) et le programme gratuit *Phylodraw* de l'Université de Pusan (<http://pearl.cs.pusan.ac.kr/phylo draw/>).

Construction des souches mutantes *mntH* et *sitABCD*:

***mntH* :** Le mutant *mntH*, de la souche χ 289 d'*E. coli* K-12, a été obtenu par la méthode de mutagenèse en une étape, du gène cible, par la recombinaison due à l'intervention de la recombinaison Red du phage λ (25). Des amorces spécifiques pour l'interruption du gène *mntH* (Tableau 3) ont été utilisées pour générer un amplicon contenant une cassette de résistance à la kanamycine, bordée par des séquences homologues au gène cible. Des clones résistants à la kanamycine ont été isolés. Les amorces spécifiques du gène *mntH* ont été utilisées lors d'un PCR, afin de confirmer l'interruption du gène par la cassette, grâce à la différence dans la taille de l'amplicon. La souche QT99 a été confirmée en tant que mutant *mntH::kan*.

***sitABCD* :** Le mutant *sitABCD* de la souche d'*E. coli* APEC χ 7122 a été obtenu par échange allélique, grâce à l'utilisation d'un vecteur suicide d'échange allélique. Pour construire le vecteur d'échange allélique nous avons digéré par *PstI* le plasmide pIJ5, contenant l'opéron *sitABCD* de la souche CFT073, nous avons ainsi éliminé un fragment de restriction s'étendant du nucléotide 149 de *sitA* jusqu'au nucléotide 25 de *sitD*. Cette partie de l'opéron a été remplacée par la ligation d'une cassette *tetAR(B)* dans les sites *PstI* de pIJ5 digéré lors de l'étape précédente, donnant le plasmide pIJ43. Un fragment de

restriction par *Bss*HIII de pIJ43, contenant $\Delta sitABCD::tetAR$, a été transféré dans les sites compatibles *Asc*I du vecteur suicide pMEG-375, donnant le vecteur d'échange allélique pIJ44. La souche χ 7122 a reçu pIJ44 par conjugaison afin de remplacer l'opéron *sitABCD* par recombinaison de $\Delta sitABCD::tetAR$ en utilisant la contre-sélection par *sacB* tel que précédemment décrit (31). La souche dérivée QT205 a été confirmée, par PCR avec des amorces spécifiques (voir Tableau 3) en tant que recombinant $\Delta sitABCD::tetAR$ résultant d'un double crossing-over.

Transport des isotopes radioactifs de Fe^{2+} et Mn^{2+} :

Protocole général de transport : Pour le transport des isotopes radioactifs $^{55}Fe^{2+}$ et $^{54}Mn^{2+}$, nous avons adapté le protocole de Silver et Kralovic tel que utilisé par Kehres et Maguire (61, 103). Toutes les étapes ont été réalisées dans des contenants en polypropylène pour diminuer la contamination en ions métalliques. Les bactéries ont été incubées durant la nuit dans le bouillon de Tryptone diluée (DT) avec 0,25 % NaCl, additionné de 0,4% de glucose, d'histidine et de thiamine avec des antibiotiques appropriés, à une température de 37°C, pH=7 et une agitation modérée (environ 220 rpm) dans des tubes de polypropylène. La population a été ajustée à une DO_{600} de 0,5. Les cellules ont été centrifugées pendant 10 min à 3000 g, lavées deux fois par du DT à température de la pièce, puis divisées en aliquotes d'un volume de 1 ml dans des microtubes de 2 ml. La suite des manipulations a été menée à la température de la pièce, excepté pour le cas particulier du transport à différentes températures. Les isotopes $^{55}Fe^{2+}$ et $^{54}Mn^{2+}$ ont été acquis de *NEN (Perkin-Elmer®)*. Les isotopes ont été ajoutés à une concentration adaptée, dans un volume de 2 μ l à partir des solutions aqueuses concentrées 500X, sauf pour les contrôles de bruit de fond sans isotope. Le temps de transport a été de 3 min, par la suite les échantillons ont été centrifugés à 3000 g durant 4 min et lavés trois fois par du DT, sauf en ce qui concerne les contrôles d'isotope qui ne contenaient que 2 μ l de solution d'isotope sans bactéries. Après le lavage final tous les culots des échantillons ont été resuspendus dans les gouttes résiduelles de la solution de lavage et mélangées avec 2 ml de cocktail de scintillation. Le cocktail de scintillation utilisé fut *Optiphase* de *Wallac®* commercialisé par *Perkin-Elmer®*. Tous les échantillons ont été analysés en triplicata.

Appareillage : Le lecteur utilisé a été *MicroBeta TriLux* de *Wallac*[®] avec des plaques adaptatrices pour des microtubes de 2 ml. La lecture a été faite grâce au protocole réalisé pour chacun des isotopes sur l'interface informatique du lecteur.

Fe²⁺ : Le ⁵⁵Fe²⁺ a été utilisé à une concentration finale de 100 nM. L'intervalle de lecture a été définie aux canaux [1-400] (61). Le lecteur a été normalisé par rapport aux contrôles d'isotopes de 100 nM. Les résultats présentés sont la moyenne des triplicata dont la moyenne du bruit de fond a été soustraite.

Mn²⁺ : Le ⁵⁴Mn²⁺ a été utilisé à une concentration finale de 50 nM. L'intervalle de lecture a été définie aux canaux [401-945] (61). Le lecteur a été normalisé par rapport aux contrôles d'isotopes de 100 nM. Les résultats présentés sont la moyenne des triplicata dont la moyenne du bruit de fond a été soustraite.

Transport de Mn²⁺ à températures différentes : Les préparatifs de transport ont été réalisés comme décrit précédemment, excepté que des échantillons ont été divisés en deux groupes, dont un à température de la pièce et l'autre sur glace. La manipulation des échantillons sur glace a été faite dans une centrifugeuse réfrigérée à 4° C dans une chambre froide. Trois temps de transport ont été utilisés : 1, 2 et 3 min.

Transport de Mn²⁺ à pH différents : La préparation des échantillons s'est faite comme décrit précédemment, excepté que les triplicata des échantillons ont été lavés et resuspendus dans du DT au pH ajusté aux valeurs suivantes : 5, 6, 7, 8 et 9. Le temps de transport était de 3 min.

Test de sensibilité au H₂O₂ :

Le test de sensibilité au peroxyde d'hydrogène a été réalisé tel que décrit précédemment par la méthode de diffusion du H₂O₂ concentré à 30%, à partir d'un filtre de 7 mm, placé au milieu d'une couche d'agar semi-solide, contenant la population bactérienne de la souche à analyser (9).

Prévalence et localisation de *sitABCD* dans les souches d'*E. coli* :

Les 300 souches cliniques d'*E. coli* pathogènes aviaires (APEC), qui ont été classées en accord avec leur virulence dans les poussins âgés d'un jour ont été décrites précédemment (31). Les 72 souches qui composent la collection ECOR (*E. coli*

Reference Collection), sont un aperçu de la diversité des souches d'*E. coli* et ont été classées par groupes phylogénétiques grâce à l'analyse par électrophorèse à loci enzymatiques multiples (MLEE) (81). Les souches ExPEC humaines ont été fournies par Dr. James R. Johnson de l'Université de Minnesota. Des souches intestinales et ExPEC humaines, porcines et des isolats fécaux non pathogènes de la volaille, ont été fournis par Dr. John M. Fairbrother de l'Université de Montréal.

Afin de déterminer la localisation de l'opéron *sitABCD*, les plasmides des diverses souches analysées ont été préparés tel que décrit par Kado et Liu, les ADN génomiques ont été extraits par la méthode standard décrite par Sambrook. Le transfert et l'hybridation ont aussi été réalisés selon la technique standard (57, 99).

Infection expérimentale dans le modèle aviaire :

Procédure générale : L'infection expérimentale des jeunes poulets Leghorn, âgés de trois semaines, libres de tout pathogène et acquis de *Sunrise Inc*, a été réalisée tel que décrit précédemment. En bref, des jeunes poulets de 3 semaines d'âge, libres de la présence des pathogènes ont été inoculés dans le sac aérien thoracique droit avec une suspension d'un volume de 0,1 ml contenant $1 \cdot 10^7$ UFC de la souche $\chi 7122$ ou de sa dérivée mutante. Les oiseaux ont été euthanasiés 48 heures après l'infection et la quantification des bactéries tissulaires a été réalisée tel que décrit précédemment (31).

Statistiques : Le test de χ^2 a été utilisé pour comparer les résultats des différentes souches et déterminer la signification statistique des différences observées.

VII Résultats :

Caractéristiques de la région de l'opéron *sitABCD* d'*E. coli* $\chi 7122$:

L'identification de la région *sitABCD* d'*E. coli* : Une séquence partielle, homologue à *sitA*, fut découverte chez la souche MT512 (O2 : K1) d'*E. coli* APEC par hybridation substractive du génome de MT512 avec celui de la souche aviaire non-pathogène EC79 d'*E. coli* (O2 : K-) (23). Après traduction, cette séquence de 194 pb

(numéro d'accès Genbank : AY187872), présentait une identité de 66% et une similarité de 82% avec SitA de *S. typhimurium* (numéro d'accès Genbank : AF128999) (117).

Nous avons utilisé la séquence homologue à *sitA* de MT512 pour chercher les banques de données des séquences génétiques disponibles sur l'internet. Les opérons homologues à *sitABCD* de *S. typhimurium* ont été identifiés dans les génomes publiés de la souche d'*E. coli* uropathogène CFT073 (114) et des souches de *S. flexneri* 2a (53, 113).

Nous avons utilisé les séquences des opérons de CFT073 et *S. flexneri* afin d'obtenir des amorces de PCR pour *sitA* et *sitD* (Tableau 3). Ces amorces ont été utilisées pour cibler le génome de la souche χ 7122, qui a été trouvée positive pour la présence des deux gènes, alors que la souche χ 289 d'*E. coli* K-12 fut négative. Nous avons donc procédé au criblage d'une banque cosmique de la souche χ 7122 qui contenait les régions d'ADN non-K-12 (13). Le cosmide numéro 6 (C-6) a été positif pour les deux gènes.

Nous avons utilisé l'endonucléase de restriction *Hind*III qui ne peut couper à l'intérieur de l'opéron *sitABCD* d'*E. coli* CFT073, *S. flexneri* et *S. typhimurium*, pour sous-cloner un fragment de 8,2 kb, contenant l'opéron *sitABCD* dans le vecteur pACYC184. Le plasmide résultant fut nommé pIJ28 (Tableau.2) Parallèlement à cela, nous avons amplifié l'opéron *sitABCD* à l'aide des amorces contenant des sites de restriction *Hind*III et dirigées contre la région intergénique précédant *sitA* et suivant *sitD* d'*E. coli* CFT073. Nous avons obtenu un amplicon d'environ 4,5 kb que nous avons ligué dans les sites *Hind*III du vecteur pWSK29 en obtenant ainsi le plasmide pIJ5 (Tableaux 2 et 3). Il est à noter que ces mêmes amorces n'ont pu amplifier l'opéron de χ 7122, ce qui témoignait de la variabilité génétique de la région bordant l'opéron *sitABCD*.

L'opéron est situé sur un plasmide de virulence : La souche χ 7122 contient trois grands plasmides nommés pAPEC-1, 2 et 3. Le plasmide pAPEC-1 est le plus grand des trois plasmides, sa taille étant d'environ 130 kb et il encode plusieurs facteurs de virulence connus; l'autotransporteur hémagglutinine-hémoglobine protéase Tsh, ainsi que les systèmes de synthèse et les récepteurs des sidérophores aérobactine et salmochéline (31).

La souche χ 7274 est un dérivé de χ 7122 qui a perdu pAPEC-1 (Tableau 1). Lors des criblages par PCR nous avons décelé l'absence de *sitA* et *sitD* chez la souche χ 7274

et en avons conclu que *sitABCD* était, chez χ 7122, situé sur le plasmide pAPEC-1. Par contre, chez la souche CFT073 d'*E. coli* et *S. flexneri* 2a l'opéron *sitABCD* est chromosomique.

Nous avons confirmé la localisation plasmidique de l'opéron *sitABCD* de la souche χ 7122, pour ce faire, nous avons transformé la souche sidérophore déficiente 1017 d'*E. coli* K-12 avec le cosmide C-6, puis nous avons fait pousser les clones transformés sur le milieu CAS-Agar afin de détecter une éventuelle production de sidérophores, car pAPEC-1 est reconnu comme responsable de la production de deux sidérophores différents : aérobactine et salmochéline (45, 104, 135). La production de sidérophore par 1017 transformée avec pAPEC-1, ayant été confirmée, nous avons confirmé la présence du locus aérobactine sur le cosmide C-6 par PCR avec des amorces spécifiques de *iucA* et *iutA* (6, 135). Ceci nous a permis de positionner l'opéron *sitABCD* sur pAPEC-1 à voisinage des gènes du système d'aérobactine. Par contre, le plasmide pIJ28 quant à lui ne présentait pas de production de sidérophores. Par la suite le séquençage de l'insert du plasmide pIJ28 et l'amplification PCR avec des amorces appropriées nous a permis d'affiner la distance entre *sitABCD* et le locus aérobactine à environ 3,5 kb, ce qui confirme que chez la souche d'*E. coli* APEC χ 7122 l'opéron *sitABCD* est situé sur le plasmide de virulence pAPEC-1 dans le voisinage du locus aérobactine (Figure 1, Tableaux 4 et 5).

La séquence de la région *sitABCD* : Nous avons séquencé l'insert du plasmide pIJ28 (Figure 1 et Tableau 4). Outre l'opéron *sitABCD*, cette région contient plusieurs gènes présumptifs (Figure 1). Ainsi, nous avons pu identifier un cadre de lecture ouvert homologue à une partie du gène *eno-2* d'une émolase putative de *Pseudomonas syringae*. De plus un gène homologue à *crcB*, codant pour une protéine intervenant dans la protection du chromosome de *Nitrosomonas europaea* a aussi été identifiés (15, 17). Enfin, la région immédiatement adjacente à *sitA* contient deux gènes de composantes de transposase IS1 (136). Les régions qui sont immédiatement adjacentes en 5' à IS1 et en 3' à *sitD* est à forte homologie avec le plasmide p1658/97 d'*E. coli* (acc. NC_004998). La région 5' homologue à p1658/97 contient un cadre de lecture ouvert partiel homologue à *impB*, un gène porté par p1658/97 et faisant partie d'un système de protection contre les rayons ultraviolets (Tableau 4).

La région *sitABCD* a des caractéristiques d'un îlot de pathogénicité : Le caractère hautement mosaïque de la région *sitABCD* de la souche χ 7122 (présence de nombreux cadres de lecture homologues à ceux retrouvés chez des espèces différentes de bactéries autres que *E. coli* K-12 et souvent tronqués), la présence des gènes relatifs aux séquences d'insertion IS et les variations de contenu G+C des différents cadres de lecture ouverts de cette région suggère qu'elle a été acquise par un événement de recombinaison avec, ou de transposition à partir, d'un plasmide ancestral à pAPEC-1 (Figure 1 et Tableau 4). Ces caractéristiques sont aussi fréquemment associées avec des îlots de pathogénicité (29,37).

La région du promoteur de l'opéron *sitABCD* contient plusieurs séquences régulatrices : L'opéron *sitABCD* débute avec le gène *sitA*, à la position 1574 à partir du premier nucléotide du site *HindIII* en 5' de l'insert. Le gène *sitA* est précédé du promoteur de l'opéron *sitABCD*. La région du promoteur de *sitABCD* contient plusieurs séquences de liaison (boîtes) pour les protéines régulatrices qui peuvent activer ou encore inhiber, l'expression des gènes codant pour le système SitABCD (Figure 2).

Ces séquences régulatrices potentielles plus ou moins conservées sont les sites putatifs de liaison des régulateurs MntR, Fur, OxyR, SoxS et Zur. Les positions réciproques de ces séquences sont : Fur (1481-1500), OxyR (1505-1538), MntR (1520-1542), Zur (1548-1574) et SoxS (1496-1529) (Fig.2). Parmi ces séquences la plus conservée est celle qui permet l'action du régulateur de transport de manganèse MntR, située entre 1520-1542 cette séquence est environ 86% homologue à la séquence consensus de la boîte de liaison MntR (86).

Le régulateur du transport de fer, Fur quant à lui, se fixerait à une séquence putative de liaison située entre 1481-1500 et homologue à 79% à la région de liaison de Fur telle que proposée par Hantke et Patzer pour le gène *mntH*, le palindrome de la boîte Fur étant conservé dans le promoteur *sit* (86). Le promoteur semble aussi régulé par trois autres protéines dont les séquences putatives de liaison sont moins conservées.

OxyR, le régulateur de la réponse au stress oxydatif induit par H₂O₂, possède une séquence de liaison située entre 1505-1538 et homologue à 67% à la région de liaison telle que présentée par Tao (132).

Le régulateur du transport du zinc Zur à une séquence putative située entre 1548-1574 et dont l'homologie partielle s'élève à 59% (84, 85).

SoxS le régulateur de la réponse au stress oxydatif induit par O_2^- avec une homologie de 48% à la région de liaison telle que présentée par Gaudu et Weiss (133).

Il est à noter que la séquence de liaison de OxyR contient tous les nucléotides jugés essentiels à la fixation du régulateur. Quant à Zur, le régulateur du transport du zinc, sa séquence conservée étant un palindrome organisé autour d'un axe central, la partie 5' du palindrome, la plus éloignée du début de l'opéron *sit* semble la plus conservée avec une homologie de 82% de conservation des nucléotides essentiels à la liaison du régulateur, alors que la partie 3' est moins conservée avec 45% de conservation des nucléotides essentiels à la liaison. En ce qui concerne la séquence potentielle de liaison de SoxS, elle présente une conservation de 55% des nucléotides indispensables à la liaison du régulateur avec la conservation partielle des deux parties du palindrome. Il est donc possible que les séquences putatives Zur et SoxS ne soient pas de sites de liaison fonctionnels.

Gènes de l'opéron *sitABCD* et protéines du système SitABCD : Le promoteur *sit* est suivi par les gènes de l'opéron : *sitA* en 1574-2488, *sitB* en 2488-3315, *sitC* en 3312-4169 et *sitD* en 4166-5023 (Figure 1). L'opéron *sitABCD* a donc une étendue totale de 3449 paires de bases. Le chevauchement des codons de départ et d'arrêt des gènes confirme que les gènes sont cotranscrits. La séquence de l'opéron présente un contenu G+C moyen de 50,32 ce qui est semblable à celui d'*E. coli* K-12 qui est de 50,1 environ (Tableau 4). Nous avons utilisé les séquences en acides aminés des protéines SitA, SitB, SitC et SitD déduites à partir des gènes correspondants afin de cribler les bases de données contenant les séquences protéiques et accessibles par l'application BLAST de NCBI. La séquence des acides aminés déduite du gène *sitA* contenait le domaine conservé LraI, qui est caractéristique des protéines de liaison périsplasmiques, la séquence de SitB contenait un domaine conservé homologue à ZnuC l'identifiant en tant que composante liant l'ATP et enfin SitC et SitD présentaient le domaine conservé ABC-3 qui les identifiait en tant que composantes de la perméase transmembranaire du système

SitABCD (Tableau 5) SitABCD est donc un système de transport ABC (Figure 3) (134, 137).

SitABCD a des homologues multiples parmi les autres espèces bactériennes :

Nous avons recueilli les protéines présentant une homologie avec les protéines Sit et avons utilisé l'alignement des séquences protéiques afin de construire des arbres phylogénétiques des systèmes apparentés à SitABCD (Tableau 5, Figure 4 a-d). D'après les arbres obtenus nous pouvons conclure que les plus proches homologues du système SitABCD d'*E. coli* χ 7122, comme nous pouvions nous y attendre, sont ceux d'*E. coli* CFT073 et de *S. flexneri* 2a. Aussi, SitA et SitB de χ 7122 sont plus proches de ceux de *Shigella*, que de ceux d'*E. coli* CFT073. Alors que pour SitC et pour SitD, *E. coli* CFT073 et *S. flexneri* sont également proches. Il est à noter que les protéines Sit d'*E. coli* χ 7122 sont avec celles d'*E. coli* CFT073, de *S. flexneri* et de *S. enterica*, plus proches des protéines de *Agrobacterium tumefaciens* et *Sinorhizobium meliloti*, que de celles du système YfeABCD de *Y. pestis* qui (bien qu'étant une entérobactérie) se retrouve plus proche des bactéries Gram- de la famille des Pasteurellacées (Tableau 5, Figure 4 a-d). Il faut aussi souligner que de nombreux homologues du système Sit sont présents chez des espèces hautement pathogènes (Figure 5).

Transport du fer :

Croissance d'un mutant sidérophore déficient complétement par *sitABCD*

Quand la souche mutante 1017 d'*E. coli* K-12, déficiente dans la synthèse du sidérophore entérobactine, unique sidérophore chez les souches K-12 d'*E. coli*, a été transformée par le plasmide pIJ28, contenant l'opéron *sitABCD*, elle a retrouvé la capacité de croître dans un milieu appauvri en ions métalliques divalents par l'addition du chélateur DIP (Figure 5). La croissance de la population bactérienne ayant été analysée par la D.O.₆₆₀, nous avons trouvé qu'après 10 heures, la population de 1017 complétement par pIJ28 a atteint une D.O.₆₆₀ de 0,95, proche de celle de 1017 complétement avec le plasmide pABN1 qui porte le locus aérobactine et permet donc la synthèse et l'utilisation de ce sidérophore (D.O.₆₆₀ de 0,98) (6). Ces valeurs étant bien plus élevées que celle atteinte par la souche 1017 transformée par le vecteur pACYC184 (D.O.₆₆₀ de 0,18), qui a servi de témoin négatif. De plus l'opéron *sitABCD* seul, porté par

pIJ28, a été capable de compléter la mutation *ent* aussi bien que le cosmide C-6 de faible nombre de copies, à l'origine de la région *sitABCD* clonée dans pIJ28 et contenant de plus le système aérobactine. De plus, des résultats similaires ont été observés avec le plasmide de faible copie pIJ5, contenant l'opéron *sitABCD* cloné par PCR à partir de la souche d'*E. coli* uropathogène CFT073 (114).

Dans une souche sidérophore négative, la présence de *sitABCD* entraîne une régulation Fur dépendante : Nous avons employé un test utilisant la fusion du promoteur du gène *fhuA* avec le rapporteur *lac* sur milieu Macconkey pour confirmer que SitABCD intervient bien dans le transport de fer. La présence de *sitABCD* dans la souche H1771 d'*E. coli* K-12, mutante *aroB* et *feoB* et déficiente dans le transport du fer ferrique et ferreux, a permis la répression de la fusion *fhu::lac* par le complexe Fur-Fe²⁺. On pouvait en déduire qu'on assistait à une entrée de fer dans la souche mutante en présence de SitABCD. La présence des ions Fe²⁺ intracellulaires mène à la formation de complexes Fur-Fe²⁺ qui peuvent se fixer sur la boîte Fur du promoteur de *fhuA* et d'inhiber l'expression de la fusion *lac*. La répression de la fusion *lac* entraîne un changement de phénotypes des colonies H1771 sur milieu Macconkey additionné de 40 µM de Fe²⁺, qui passent du rouge (*lac* exprimé) à blanc (*lac* réprimé) (58).

SitABCD permet l'entrée de Fe²⁺ dans un mutant déficient dans le transport du fer : Lors des essais de transport de l'isotope radioactif ⁵⁵Fe²⁺, la souche H1771 transformée par le plasmide pIJ28 porteur de l'opéron *sitABCD*, a été capable de transporter le fer avec une efficacité 2,5 fois plus grande que la souche H1771 transformée par le vecteur pACYC184 (Figure 6). De plus, la même souche transformée par pIJ42 portant le gène *mntH* n'a pas présenté de transport accru de fer. Donc l'accroissement de Fe²⁺ dans les cellules Sit positives était spécifiquement dû au transport par le système SitABCD et non à une simple diffusion passive à travers d'un transporteur d'ions métalliques divalents. D'un autre côté, le transport de fer par la souche H1771 exprimant le système SitABCD, restait bien plus faible que celui d'une souche sauvage χ 289 d'*E. coli* K-12 exprimant le système de sidérophore entérobactine et le transporteur FeoB. En effet cette souche sauvage transportait le fer avec une efficacité 4,5 fois plus grande que la souche H1771 Sit positive, bien que la différence du nombre de copies des

gènes des transporteurs favorisant le transport par SitABCD (61).

Transport du manganèse :

SitABCD transporte l'isotope radioactif $^{54}\text{Mn}^{2+}$ dans une souche mutante *mntH* : Sachant que la région du promoteur de l'opéron *sitABCD* contenait une séquence régulatrice MntR (Figure 2) et que les homologues de SitABCD chez *Y. pestis* et *S. typhimurium* se sont révélés capables de transporter le manganèse (Figure 4 a-d), nous avons voulu tester l'habilité du système SitABCD d'*E. coli* d'importer les isotopes radioactifs de ce métal (3, 61). Pour ce faire la souche QT99, mutant *mntH::kan* de la souche $\chi 289$ d'*E. coli* K-12, a été transformée par pIJ28 portant l'opéron *sitABCD*, par pIJ42 portant le gène *mntH* en tant que témoin positif et pACYC184 en tant que témoin négatif. Nous avons utilisé ces différents transformants afin de quantifier le transport de manganèse par scintillation en milieu liquide.(Figure 7) Nous avons trouvé que le système SitABCD était capable de transporter le manganèse, étant donné que la souche complémentée par pIJ28 transportait $^{54}\text{Mn}^{2+}$ avec une efficacité plus que deux fois plus grande (859,2 CPM) que la souche mutante transformée par le vecteur de clonage pACYC184 (307,3 CPM). D'un autre côté, SitABCD s'est révélé être un transporteur de manganèse plus faible que MntH car la souche complémentée par pIJ42 transportait le manganèse une fois et demi-mieux (1277 CPM) que la souche complémentée par pIJ28 (859,2 CPM). D'autre part la souche mutante complémentée par pIJ28 ou pIJ42 transportait le $^{54}\text{Mn}^{2+}$ mieux que la souche sauvage $\chi 289$ transformée par pACYC184.

Le transport de Mn^{2+} par SitABCD est dépendant du pH du milieu : Étant donné que les transports de Mn^{2+} par SitABCD et MntH de *S. typhimurium* sont dépendants du pH du milieu, SitABCD étant plus efficace que MntH à pH alcalin, (61) nous avons décidé de tester la dépendance du pH du système SitABCD d'*E. coli*. Nous avons utilisé un intervalle large de pH : d'un pH nettement acide de 5 à un pH nettement basique de 9 (Figure 8). Nos résultats sont homologues à ceux obtenus chez *S. typhimurium*, en ce qui concerne la dépendance du pH du transport de Mn^{2+} pour les deux transporteurs. En effet, lors des expériences conduites avec la souche QT99 d'*E. coli* K-12 mutante *mntH*, complémentée par pIJ28 portant *sitABCD* ou par pIJ42 portant *mntH*, nous avons constaté pour les deux transporteurs l'évolution opposée de l'efficacité de

leurs transports respectifs lors de la variation du pH de l'acide vers le basique. Ainsi, le correspondant en CPM à la quantité totale de $^{54}\text{Mn}^{2+}$ accumulée par MntH, baissait d'environ 4800 à pH=5 à 1980 à pH=9 en passant par 3250 à pH=7. Au contraire, pour SitABCD la quantité transportée passait de 280 CPM à pH=5 à 1820 à pH=9. Cependant à la différence de ce qui se passe chez *S. typhimurium*, chez *E. coli* K-12, le transport de manganèse par le système SitABCD n'a pas dépassé en efficacité le transport par MntH même dans le milieu basique à pH=9 (61).

Le transport de Mn^{2+} par SitABCD est un transport actif : Nous avons utilisé le transport de $^{54}\text{Mn}^{2+}$ à température de la pièce (22-25°C) versus 4°C afin de confirmer le caractère actif du transport de Mn^{2+} (Figure 9). La souche QT99 d'*E. coli* K-12, mutante *mntH* complétée par le plasmide pIJ28 exprimant le système SitABCD transportait le manganèse plus efficacement à température de la pièce qu'à 4°C avec une efficacité environ 3 fois plus grande. La même souche avait parallèlement été transformée par le plasmide pIJ42 portant *mntH*. Le transport par MntH était lui aussi dépendant de la température, tout en restant globalement plus efficace que le transport par SitABCD (9).

Résistance au stress oxydatif :

SitABCD contribue à l'accroissement de la résistance à l'effet toxique de H_2O_2 dans une souche mutante *mntH* : Étant donné la capacité du système SitABCD de transporter le fer et le manganèse, ainsi que la présence dans le promoteur de l'opéron *sitABCD* de séquences putatives de liaison pour OxyR régulateur de la réponse au stress oxydatif induit par H_2O_2 et SoxS régulateur de la réponse à la toxicité due au O_2^- , nous avons décidé d'investiguer l'influence de la présence du système SitABCD et du transporteur MntH sur la résistance au stress oxydatif (9). Pour cela nous avons comparé les souches : χ 289 K-12 sauvage, QT99 mutante *mntH* transformée par pACYC184, mutante *mntH* transformée par pIJ42 portant le gène *mntH* et la souche mutante *mntH* transformée par pIJ28 portant l'opéron *sitABCD* (Figure 10). La souche χ 289 d'*E. coli* K-12 a été considérée comme la référence de résistance (100%). Il s'est avéré que le système SitABCD conférait à la souche mutante *mntH* une résistance supérieure (101%) à celle conférée par la complémentation avec le gène *mntH* fonctionnel (94%), et ceci

pour des plasmides ayant la même origine de répllication. Alors que la souche mutante QT99 était nettement affaiblie dans sa capacité de croître en présence de H₂O₂ (89%).

La situation semblable a été observée avec la souche mutante *sit* QT205 et sa souche ancestrale, pathogène aviaire χ 7122. Dans ce cas l'absence du système SitABCD fonctionnel chez la souche mutante, a entraîné une perte de 3% de la résistance à la toxicité de H₂O₂, par rapport à la souche pathogène sauvage. La différence dans le niveau de sensibilité à la toxicité du H₂O₂, entre la souche QT99 *mntH* d'*E. coli* K-12 et la souche *sit* QT205 qui est dérivée d'*E. coli* pathogène aviaire, pourrait être expliquée par le fait que chez une souche pathogène il existe généralement de nombreux systèmes redondants de défense contre les effets toxiques du milieu environnant. Les souches pathogènes seraient donc moins influencées par la perte d'un de ces mécanismes.

Distribution et localisation de *sitABCD* chez les souches d'*E. coli* :

L'opéron *sitABCD* est surtout présent chez les souches ExPEC : Après avoir vérifié la prévalence des gènes *sitA* et *sitD* parmi les 72 souches d'*E. coli*, appartenant à la collection de référence ECOR, nous sommes arrivés à des résultats suggérant que *sitABCD* soit plus présent dans les groupes phylogénétiques B2 (100%) et D (67%), comparativement aux groupes B1 (47%), E et A (16%) (Figure 11). Étant donné que les groupes B2 et D englobent la majorité des souches extra-intestinales d'*E. coli*, nous pouvons avancer que *sitABCD* est associé aux souches ExPEC. Ce résultat a été confirmé par l'analyse de la prévalence de *sitA* et *sitD* parmi les souches d'*E. coli* isolées à partir des habitats différents. En effet *sitABCD* apparaissait comme étant présent chez les souches ExPEC telles que les souches APEC (90%) et urinaires (100%), plutôt que chez les souches intestinales (14,5%) et aviaires isolées des fèces des oiseaux sains (55%) (Figure 12).

L'opéron *sitABCD* n'est pas exclusivement associé avec un sérotype donné : Nous avons criblé les différents serotypes d'*E. coli* pathogènes aviaires afin de déterminer si certains d'entre eux étaient plus associés avec l'opéron *sitABCD*. Les résultats obtenus montrent que *sitABCD* n'est pas plus représenté dans les souches d'*E. coli* appartenant à un sérotype donné (Figure .13).

Chez les APEC, *sitABCD* est surtout présent chez les souches les plus virulentes : Afin de confirmer l'association du système SitABCD avec l'habilité des souches d'*E. coli* à causer l'infection, nous avons analysé la prévalence de *sitA* et *sitD* chez les *E. coli* pathogènes aviaires APEC, classées en trois groupes en accord avec leur virulence. L'opéron *sitABCD* était plus présent chez les souches les plus virulentes (98%) que chez les souches causant des infections non-létales (71%) (Figure 14).

L'opéron *sitABCD* d'*E. coli* peut être chromosomique ou plasmidique : Sachant que chez la souche uropathogène humaine CFT073 et *S. flexneri* 2a, l'opéron *sitABCD* est situé sur le chromosome, alors qu'il est plasmidique chez la souche APEC χ 7122, nous avons voulu déterminer la localisation de l'opéron *sitABCD* parmi les souches d'*E. coli* qui apparaissaient positives pour la présence de l'opéron *sit* par PCR. Pour cela les plasmides et l'ADN génomique des diverses souches ont été extraits et analysés par un transfert Southern et une hybridation à une sonde correspondant à une séquence partielle de *sitA*, marquée à la digoxygénine (Figure 15). Parmi les souches analysées la localisation de l'opéron *sitABCD* variait largement, l'opéron était plasmidique chez 57% des souches, chromosomique chez 47%, certaines souches possédaient deux copies de *sitABCD*, une plasmidique et une chromosomique dans 21% des isolats ou encore deux copies chromosomiques pour 10% des souches. Seules 7% des souches n'avaient pas d'opéron *sitABCD* chromosomique ou placé sur le plasmide que nous avons extrait (Figure 16). Il est à noter que chez la majorité des souches APEC l'opéron était plasmidique avec 77% des souches, chromosomique dans 46% des cas et enfin 31% des souches avaient deux copies de *sitABCD*, une sur le plasmide et l'autre sur le chromosome. Dans le cas des souches ExPEC humaines l'opéron était surtout chromosomique avec 73% des souches, plasmidique dans 47% des cas, à deux copies : plasmidique et chromosomique chez 13% des souches.

Infection dans le modèle expérimental aviaire :

L'infection expérimentale dans le modèle aviaire fut réalisée chez des poulets âgés de trois semaines et inoculés dans le sac aérien thoracique caudal. La nécropsie pratiquée 48 h post-infection a démontré que la souche sauvage χ 7122 et la souche

mutante *sit* QT205, provoquaient des lésions de sévérité semblable dans les sacs aériens, le péricarde et le foie chez la volaille infectée. Néanmoins, malgré des lésions similaires, le mutant *sit* persistait moins, après 48h, dans le sang (différence significative $P \leq 0,05$), les poumons ($P \leq 0,01$) et la rate ($P \leq 0,01$) des oiseaux infectés. Par contre aucune différence significative ne fut démontrée dans le sang 6 h après l'infection et dans la rate après 48 h. Les statistiques obtenues avaient (Figure. 17)

VIII Discussion :

Les caractéristiques de la région *sitABCD* de la souche χ 7122 d'*E. coli* APEC :

L'opéron *sitABCD* : L'organisation génétique de l'opéron *sitABCD* apparaît assez typique des transporteurs ABC dépendant d'une protéine de liaison périplasmique. En effet, des opérons, codant pour des systèmes ABC homologues, sont largement distribués parmi différents microorganismes. En tant que système de transport, SitABCD appartient clairement à la famille des ABC-perméases transportant les cations divalents des métaux de transition telle que décrite par Claverys (20, 125). Ainsi, la présence dans le promoteur de l'opéron des régions putatives de liaison des protéines régulatrices Fur, MntR et Zur s'explique aisément par la probable affinité de transport du système SitABCD envers les ions Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} . Il est à noter que l'affinité du système SitABCD de *S. typhimurium* envers ces ions était très élevée (61). En effet, SitABCD de *S. typhimurium* a été défini comme étant avant tout un transporteur de manganèse, son affinité pour le fer et le zinc étant inférieure, mais néanmoins supérieure à celle des autres ions (61). D'autre part, chez *S. flexneri*, SitABCD apparaît comme étant impliqué dans le transport de fer, le transport d'autres ions n'ayant pas pour l'instant été analysé (97).

Il est possible que les différences dans la séquence en acides aminés entre les protéines de SitABCD de *S. typhimurium* d'une part, et de *S. flexneri* et *E. coli* d'autre part, entraînent des changements dans l'affinité envers les différents substrats ioniques et que les systèmes SitABCD de *S. flexneri* et *E. coli* χ 7122 soient des meilleurs transporteurs de fer et/ou zinc que le système de *S. typhimurium*. Des expériences futures portant sur l'affinité et la cinétique du transport des différents substrats par SitABCD

pourraient nous éclairer à ce sujet. Notons néanmoins, la possibilité que l'éventail des substrats ioniques transportés par SitABCD puisse être relativement large.

La présence d'une séquence putative de liaison pour OxyR, en 1505-1538 dans le promoteur de l'opéron *sitABCD* de même que la présence d'une séquence putative de liaison pour SoxS en 1496-1529, permettent de présager que cet opéron est important pour la résistance au stress oxydatif (132, 133). Or Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} sont autant d'ions qui interviennent en tant que cofacteurs enzymatiques des superoxyde dismutases Fe-SOD, Mn-SOD et Zn-SOD, et dans le cas du fer et manganèse des catalases KatG et KatE, Fe-dépendantes chez *E. coli* et *S. typhimurium*, ainsi que la catalase non-hème, Mn-dépendante, KatN chez *S. typhimurium* et *E. coli* O157:H7 qui contient un gène potentiel homologue à *katN*, *z1921* (78, 107, 138). De plus il est à noter que dans le cas de la souche χ 7122 la séquence de liaison de OxyR chevauche partiellement celle de MntR entre 1520 et 1538, donc la liaison de ces deux facteurs de régulation apparaît comme mutuellement exclusive (86, 132). De même, la séquence putative de liaison SoxS chevauche celle de Fur entre 1496 et 1500 de même que celle de OxyR entre 1505 et 1529 et celle de MntR entre 1520-1529 (86, 132, 133). Il est donc probable que la régulation de l'expression de l'opéron *sitABCD*, fait intervenir une concurrence complexe des différents régulateurs pour leurs sites de liaison respectifs au sein du promoteur (Figure 2).

Les séquences d'insertion IS : La présence des gènes *insA* et *insB* qui sont des composantes de transposase associée avec la séquence d'insertion *IS1*, suggère que l'opéron *sitABCD* du plasmide pAPEC-1 provienne d'une origine inconnue par transposition dans le plasmide ancestral de pAPEC-1 (136). Il est à noter que les séquences immédiatement adjacentes à l'opéron *sitABCD* en 5-1273 et 5256-5615 sont identiques à celles de p1658/97, plasmide du type F d'*E. coli*. Ceci appuie fortement la possibilité du transfert horizontal de *sitABCD*, probablement par l'intermédiaire d'un plasmide acquis d'une source inconnue.

Les autres gènes putatifs : En dehors de l'opéron *sitABCD*, la région contient plusieurs cadres de lecture ouverte, dont une séquence démontrant une identité avec une partie du gène *eno2* de *Pseudomonas syringae* en 5492-5926, une séquence complète

correspondant au gène *crcB* de *Nitrosomonas europaea* en 6268-6648, *impB* d'*E. coli* en 3-341 et *shiF* qui chez *S. flexneri* se trouve en 5' adjacent aux gènes du système aérobactine. Il est intéressant de noter que ces gènes putatifs trouvent leurs homologues les plus proches parmi des espèces bactériennes différentes (6, 15, 17, 139).

La variabilité de contenu G+C : Les gènes de la région de l'opéron *sitABCD* présentent un contenu G+C (50,3%) proche de celui d'*E. coli* K-12 (51%). Le contenu G+C des autres gènes, *eno2* (48%), *crcB* (42%), *shiF* (61%) est éloigné de celui d'*E. coli* K-12. Seul celui de *impB* est plus proche d'*E. coli* (50,44%). En se basant sur la variabilité du contenu G+C, la présence des séquences d'insertion et l'origine des homologues les plus proches des différents gènes nous pouvons affirmer que la région de l'opéron *sitABCD* présente un caractère mosaïque.

Les plasmides p1658/97, pColV-K30 et pAPEC-1: Une question intéressante, mais très difficile à élucider reste celle de l'évolution du plasmide pAPEC-1 vers sa forme actuelle. D'après les données que nous avons actuellement nous pouvons affirmer que le plasmide pAPEC-1 est sans doute un dérivé d'un plasmide de type pColV, puisque pAPEC-1 et pColV contiennent tous les deux les loci de la colicine V, *tsh* et de l'aérobactine et une origine de répllication apparentée de type F du groupe d'incompatibilité IncFI. (31, 56 chap.3) La relation entre le plasmide de type F tel que p1658/97 et les plasmides pColV reste à établir. Il est tentant d'envisager que le plasmide F soit l'ancêtre de pColV et pAPEC-1 qui s'est enrichi de facteurs de virulence, utiles à promouvoir la survie de la bactérie hôte, par transfert horizontal. Quoiqu'il en soit, ces plasmides et pAPEC-1 en particulier, restent un excellent exemple de l'évolution des éléments génétiques bactériens en général et de celle des plasmides de virulence en particulier.

Les homologues du système SitABCD :

Les homologues les plus proches : Le système SitABCD a des nombreux homologues, identifiés en tant que transporteurs probables de cations divalents, parmi les différentes familles bactériennes. Les arbres phylogénétiques présentés reflètent la

variabilité de structure mais aussi la très grande conservation de ce type de transporteur parmi les bactéries. Les arbres sont subdivisés en amas qui regroupent les différentes familles bactériennes. Nous allons nous intéresser surtout aux proches homologues de SitABCD d'*E. coli* car une analyse complète de tout l'arbre phylogénétique dépasserait le cadre de ce travail (20, 125).

Chez les entérobactéries : C'est au sein de cette famille que nous retrouvons les plus proches homologues du système SitABCD d'*E. coli* χ 7122. Comme on aurait pu s'y attendre ce sont les systèmes de *S. typhimurium* et *S. flexneri*. Il est d'ailleurs à noter que d'une part, les protéines de SitA et SitB de *S. flexneri* sont plus proches de celles de χ 7122 que de CFT073 et que d'autre part, c'est le contraire en ce qui concerne SitC et SitD. Dans les deux cas les transporteurs d'*E. coli* et *S. flexneri* sont groupés ensemble de façon très nette et séparément de ceux de *S. enterica* sérovar Typhi et Typhimurium (Figure 4 a-d). Il est à noter qu'un autre représentant de la famille des entérobactéries, *Y. pestis*, voit son transporteur YfeABC classé dans le groupe des *Pasteurellaceae* avec *Pasteurella* et *Haemophilus*. Il est d'ailleurs significatif que chez certains représentants de ce groupe, le système de transport ne contienne qu'un seul type de domaine transmembranaire, tel que YfeC de *Y. pestis* qui, une fois dimérisé, formera la perméase transmembranaire. Par contre chez *E. coli*, *S. flexneri* et *S. typhimurium* nous avons deux domaines transmembranaires putatifs, SitC et SitD qui bien que fortement homologues, sont néanmoins distincts. Ainsi, même au sein de la famille des entérobactéries les transporteurs homologues de SitABCD ont probablement été acquis de manière divergente (97, 117).

Les homologues des protéines Sit dans d'autres familles bactériennes : Parmi les homologues proches de SitABCD d'*E. coli* χ 7122 il y a aussi des bactéries appartenant à des familles autres que les entérobactéries (Figure 4 a-d). Les arbres des protéines homologues de SitABCD, semblent dans ce cas suivre, à peu d'exceptions près, les subdivisions par famille qui se confondent avec les subdivisions par la niche écologique des bactéries. En effet, on remarque groupés ensemble les cyanobactéries fortement apparentées telles que *Thermosynechococcus elongatus*, *Prochlorococcus marinus* et *Synechococcus sp* d'une part et *Agrobacterium tumefaciens* et

Sinorhizobium meliloti, qui bien que n'étant pas des microorganismes proches partagent une niche écologique semblable, celle de la symbiose/parasitisme chez les plantes. Il en va de même de la famille des *Pasteurellaceae* et nous avons mentionné l'exception que représente l'association de *Y. pestis* avec les membres de cette famille (4, 140,141).

Origine du système SitABCD d'*E. coli* : Si nous suivons l'évolution de l'arbre phylogénétique des homologues proches de la protéine SitA d'*E. coli* χ 7122, nous pouvons constater 8 nœuds phylogénétiques divergents à partir d'un ancêtre hypothétique de cette protéine et la version actuelle de celui-ci telle que présente chez *E. coli* χ 7122 (Figure 4 a encadré **). Les quatre premiers nœuds divergents aboutissent aux protéines des cyanobactéries, le cinquième nœud aboutit aussi aux protéines de *Yersinia* et des *Pasteurellaceae*, le sixième nœud mène vers les protéines de *S. typhimurium*, *E. coli* et *S. flexneri* ainsi que de *A. tumefaciens* et *S. meliloti*. Par la suite le septième et le huitième nœuds séparent les entérobactéries des bactéries agricoles. Ainsi, comme on pouvait s'y attendre les protéines SitA de *S. typhimurium*, *E. coli* et *S. flexneri* ont un ancêtre commun. Il est à noter que cet ancêtre semble être directement lié à celui des bactéries spécialisées dans le parasitisme/symbiose avec les plantes, tels *A. tumefaciens* et *S. meliloti*. Il est difficile de tirer des conclusions définitives de cette relation, mais étant donné que la même association existe aussi entre les autres protéines du système SitABCD, elle ne semble pas fortuite. Quant à la divergence des systèmes SitABCD de *S. typhimurium*, *E. coli* et *S. flexneri* elle s'explique aisément par l'adaptation de chacun de ces pathogènes à leur hôte et type d'infection respectif.

SitABCD transporte de fer et de manganèse :

SitABCD en tant que transporteur du fer : La présence de la séquence de la boîte Fur en amont de l'opéron *sitABCD* de la souche uropathogène CFT073 d'*E. coli* (114, NC_004431.1), de même que les informations indiquant que YfeABC de *Y. pestis* (4) et SitABCD de *S. typhimurium* (52, 117) sont capables de transporter le Fe^{2+} , nous ont poussé à considérer SitABCD d'*E. coli* en tant que transporteur de Fe^{2+} (Figures 2 et 4 a-d). Les résultats obtenus lors des tests de croissance en milieu pauvre en fer pour la souche 1017 d'*E. coli* K-12, mutante *ent*, donc déficiente dans la synthèse du sidérophore

unique des *E. coli* K-12 et par conséquent dans le transport de fer, nous ont montré que SitABCD était impliqué dans le transport de fer (Figures 5 et 6). En effet, comme nous avons décrit dans le paragraphe correspondant, SitABCD s'est révélé capable de compléter la mutation *ent* et de restaurer la capacité de la souche mutante à croître en milieu appauvri en fer par la présence du chélateur 2,2'-Dipyridyl (Figure 5). De plus, nous avons confirmé de façon indirecte l'entrée du fer dans la cellule, en présence de SitABCD, par le test à la fusion *fhu::lac*, régulée par le dimère Fur associé à l'ion Fe^{2+} , chez la souche mutante *feo* et *aro* H1771, déficiente dans le transport du fer ferreux et ferrique. Enfin, nous avons directement déterminé, par la scintillation en milieu liquide, que le système SitABCD permettait à la souche H1771 d'accumuler l'isotope radioactif $^{55}Fe^{2+}$ (Figure 6). Il apparaît donc certain que le système SitABCD transporte le Fe^{2+} .

Ce qui est difficile à quantifier c'est l'importance de l'apport de SitABCD dans le transport global du fer par la souche χ 7122. En effet, nous savons que les systèmes bactériens de transport de fer sont hautement redondants (1). Ainsi, la souche χ 7122 possède quatre systèmes connus de transport de Fe^{3+} impliquant des sidérophores tels que l'entérobactine, l'aérobactine et la salmochéline (26, 30). De plus, des systèmes de capture des sidérophores exogènes tels le ferrichrome et des systèmes de plus faible affinité, tels celui de l'import de complexes citrate- Fe^{3+} , peuvent aussi contribuer au transport de Fe^{3+} et enfin le système FeoABC permet l'import du Fe^{2+} (1, 58, 97). SitABCD n'est donc qu'un des systèmes de transport de fer parmi d'autres et son importance relative dans le transport de fer reste difficile à affirmer avec certitude. En effet, d'une part SitABCD apparaît capable de compléter la mutation *ent* de la souche 1017 d'*E. coli* K-12 (incapable de synthétiser l'entérobactine, mais capable d'utiliser son transporteur FeoB) avec des résultats comparables de ceux de l'opéron aérobactine. D'autre part, le transport de $^{55}Fe^{2+}$ par SitABCD dans la souche mutante *feoB* et *aro* H1771, s'est révélé être inférieur à celui de la souche sauvage χ 289 capable de synthétiser l'entérobactine et d'utiliser le transporteur FeoB.

Il est donc difficile de juger qui de FeoB, SitABCD ou du système de transport par entérobactine joue le rôle le plus important dans le transport bactérien de fer chez *E. coli*. Évidemment la situation est d'autant plus complexe chez les souches qui comme χ 7122, possèdent d'autres systèmes d'acquisition de fer. Il est aussi possible que chacun de ces systèmes ait un rôle important à jouer dans des conditions de niche écologique ou

de site anatomique spécifique. Des expériences futures avec des copies uniques des opérons *feoABC* et *sitABCD*, ainsi que des mutants *feo* et *sit* de $\chi7122$ permettraient de lever cette ambiguïté sur l'importance de chacun des transporteurs et de préciser leur rôle respectif.

SitABCD en tant que transporteur du manganèse : Les résultats obtenus pour le système YfeABCD de *Y. pestis* (3) et le système SitABCD de *S. typhimurium* (9, 61) nous ont mené à considérer le système SitABCD d'*E. coli* en tant que transporteur potentiel de Mn^{2+} . La présence de la séquence de liaison du régulateur MntR en amont de l'opéron *sitABCD*, de même que le haut degré d'homologie des protéines SitA,B,C et D avec des protéines appartenant aux systèmes ABC reconnus comme étant des transporteurs spécifiques de Mn^{2+} , ont servi d'indices indirects quant à la capacité probable de SitABCD de transporter le Mn^{2+} (Figures 2 et 4 a-d) (20, 86). La confirmation directe du fait que SitABCD est un transporteur de Mn^{2+} , a été obtenue par la scintillation en milieu liquide, suite à l'accumulation de l'isotope radioactif $^{54}Mn^{2+}$. Comme décrit dans le paragraphe correspondant, SitABCD s'est avéré capable de compléter la mutation *mntH* de la souche d'*E. coli* K-12 QT99 et de restaurer à cette souche la capacité d'accumuler le Mn^{2+} (Figure 7).

Le transport de Mn^{2+} par SitABCD s'est avéré pH dépendant avec une plus haute efficacité à pH alcalin (Figure 8) et actif (Figure 9), comme d'ailleurs celui de *S. typhimurium*. Contrairement à *S. typhimurium* l'efficacité de transport de SitABCD n'a pu dépasser celle de MntH et cela même à un pH alcalin (9, 61). À la différence de ce qui se passe chez *S. typhimurium*, chez *E. coli* SitABCD n'est donc pas le principal transporteur alcalin de Mn^{2+} (Figure 8). Il reste actuellement à caractériser le système SitABCD d'*E. coli* du point de vue de la cinétique du transport de Mn^{2+} . Ceci pourrait se faire par comparaison des mutants *sit* avec le type sauvage ou encore le mutant complétement par des plasmides en copie unique portant l'opéron *sitABCD* chez la souche $\chi7122$. Le même genre d'expériences devrait être réalisé avec des mutants *mntH* de la souche $\chi7122$.

Transport du fer et celui du manganèse : Le système SitABCD apparaît donc comme étant un transporteur capable fournir à la bactérie à la fois le Fe^{2+} et le Mn^{2+} .

Son expression est probablement régulée par les deux répresseurs qui contrôlent le transport de ces ions chez *E. coli* et les autres entérobactéries, à savoir Fur et MntR car les séquences putatives de liaison de ces deux régulateurs sont présentes dans la région du promoteur des opérons *sitABCD* d'*E. coli* χ 7122, *S. typhimurium* et *S. flexneri* 2a. Néanmoins, la question de l'affinité envers le substrat subsiste. En effet, nous pouvons nous interroger sur l'importance relative du transport de chacun des deux ions. La réponse définitive à ces interrogations viendra des études de la cinétique de transport chez les mutants *sit* et *mntH* de la souche χ 7122 et de ces mêmes mutants complémentés par des plasmides de très faible (de préférence unique) copie portant le gène *mntH* et l'opéron *sitABCD*, ainsi que chez la souche parentale χ 7122.

En attendant les données de telles études nous pouvons essayer de s'approcher de la quantification du transport de ces ions en utilisant les résultats qui nous sont actuellement disponibles (Figures 6 et 7). Évidemment, tous ces calculs ne peuvent être qu'approximatifs et les conclusions obtenues ne seraient qu'indicatives d'une réalité à confirmer par des expériences à venir.

Nous commencerons par le transporteur MntH puis nous passerons à SitABCD afin de comparer l'efficacité de transport du manganèse pour les deux transporteurs, mais aussi de déterminer si SitABCD représente plus un transporteur de Mn^{2+} ou de Fe^{2+} .

Transport de Mn^{2+} :

Valeurs connues :

Population cellulaire 10^8 Cel / ml

Temps de transport 3 min

Standard $^{54}Mn^{2+}$ contenant 50 pmol : 9450 CPM

La souche K-12 sauvage (1 copie unique de *mntH*) : 456 CPM

Mutant *mntH* (pas de *mntH* fonctionnel) : 307 CPM

Le mutant complémenté par pIJ42 (X copies *mntH*) : 1277 CPM

Le mutant complémenté par pIJ28 (X copies *sitABCD*) : 859 CPM

Calculs :

Quantité de Mn^{2+} accumulé par les transporteurs exprimés par une copie de *mntH* :

$456 - 307 = 149$ CPM.

Quantité accumulée par X copies de *mntH* : $1277 - 307 = 970$ CPM

Nombre de copies de *mntH* : $970/149 = 6,5$ donc entre 6-7 par cellule.

Quantité accumulée par min : $149/3 = 49,7$ CPM/copie/min/ml de culture bactérienne

La scintillation par pmol de $^{54}\text{Mn}^{2+}$ = $9450/50 = 189$ CPM

Quantité accumulée par min $49,7/189 = 0,26$ pmol/copie/min/ml de culture bactérienne

Quantité accumulée par cellule $0,26 \cdot 10^{-8}$ pmol/copie/min/bactérie

Donc affinité pour le Mn^{2+} des transporteurs cellulaires MntH encodés par un gène *mntH* en copie unique (pH=7) :

$$\underline{0,26 \cdot 10^{-8} \text{ pmol/min}}$$

En utilisant la même approche pour *SitABCD* l'affinité calculée pour le Mn^{2+} des transporteurs cellulaires encodés par un opéron *sitABCD* en copie unique (pH=7) :

$$\underline{0,15 \cdot 10^{-8} \text{ pmol/min}}$$

Transport de Fer :

Valeurs connues :

Population cellulaire 10^8 Cel / ml

Temps de transport 3 min

Standard $^{55}\text{Fe}^{2+}$ 100 pmol = 349612 CPM

Nombre de copies de *sitABCD* par cellule : 6,5 (6-7 copies) déduite précédemment.

Quantité de Fe^{2+} accumulée par le mutant *aro, feoB* : 1667 CPM

Quantité de Fe^{2+} accumulée par le mutant complétement par pIJ28 : 4486 CPM

Calculs :

Quantité accumulée par les systèmes *SitABCD* : $4486 - 1667 = 2819$ CPM/ml de culture

Quantité accumulée par les systèmes *SitABCD* par min : $2819/3 = 939,7$ CPM/min/ml

Quantité accumulée par les transporteurs encodés par une copie unique de *sitABCD* :
144,6 CPM/min/copie/ml

Quantité CPM par pmol de $^{55}\text{Fe}^{2+}$: $349612/100 = 3496,1$ CPM/pmol

Quantité accumulée en pmol : $144,6/3496,1 = 0,04$ pmol/min/copie/ml

Quantité accumulée par cellule bactérienne : $0,04 \cdot 10^{-8}$ pmol/min/copie/bactérie

Affinité calculée pour le Fe^{2+} des transporteurs cellulaires encodés par un opéron *sitABCD* en copie unique (pH=7) :

$$\underline{0,04 \cdot 10^{-8} \text{ pmol/min}}$$

Il apparaît donc que SitABCD transporte le Mn^{2+} presque quatre fois plus efficacement que le Fe^{2+} . Ces résultats, bien qu'approximatifs, sont similaires à ceux obtenus chez *S. typhimurium*, où SitABCD s'est avéré avant tout comme étant un transporteur de manganèse (61).

Soulignons encore que nos calculs ne fournissent que des estimations basées sur des approximations. En effet, le nombre de gènes est calculé pour *mntH* à 6-7 par cellule bactérienne et appliqué aussi à *sitABCD* en partant du fait que les deux plasmides pIJ28 et pIJ42 basés sur le vecteur de clonage pACYC184 ont la même origine de répllication p15A, mais il est possible que la taille de l'insert, l'environnement génétique ou la régulation rendent l'expression des gènes *mntH* et *sitABCD* différente. Il est possible aussi que le transport n'ait pas été linéaire pendant les 3 min, ce qui changerait l'affinité des deux transporteurs pour chacun des deux ions. Enfin, il est difficile de juger du nombre de copies de *sitABCD* présents dans bactérie qui se prépare à se diviser. Car dans le cas des cellules faisant partie des populations en phase de croissance le chromosome et les autres éléments génétiques sont constamment en voie d'être répliqués.

Seules les expériences de cinétique de transport avec des mutants *feo*, *mntH* et *sitABCD* de la souche $\chi 7122$, ainsi que ces gènes et opérons sur des plasmides à copie unique, permettront de valider ou d'invalider ces résultats.

SitABCD entant que transporteur potentiel des cations divalents des métaux de transition : Nous avons aussi souligné qu'outre les séquences régulatrices de liaison pour MntR et Fur, l'opéron *sitABCD* contient aussi la séquence de liaison, partiellement conservée, de la protéine Zur qui est un homologue de Fur, régulant l'import de Zn^{2+} (Figure 2) (84, 85). Il est donc possible que SitABCD soit aussi impliqué dans le transport de Zn^{2+} , d'autant plus que chez *S. typhimurium* une telle possibilité a déjà été investiguée et l'affinité du système SitABCD pour Zn^{2+} s'est avérée proche de celle pour le Fe^{2+} (61).

SitABCD est donc potentiellement un transporteur polyvalent de cations métalliques, alors que les autres transporteurs connus de cations divalents des métaux de transition, tels Znu, MntH et FeoB semblent être très spécifiques dans leur affinité de substrat.

Il existe donc une possibilité que SitABCD soit un transporteur qui importe les trois cations métalliques divalents : Mn^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} impliqués dans la gestion du stress oxydatif chez les procaryotes et les eucaryotes. Des expériences avec le transport de l'isotope radioactif de Zn^{2+} et aussi des ions compétiteurs non marqués, pourraient éclairer sur les capacités de SitABCD d'*E. coli* de transporter les différents cations métalliques.

Importance du transport des cations métalliques divalents par SitABCD :
Nous avons montré que SitABCD n'est pas le transporteur primaire de Mn^{2+} ou de Fe^{2+} (Figures 6 et 7). Nous savons que son transport est ATP dépendant et exige donc des dépenses énergétiques de la part de la cellule bactérienne (Figure 9). Or la conservation des systèmes homologues à SitABCD chez de nombreuses espèces bactériennes, de même que la présence de l'opéron *sitABCD* chez de nombreuses souches pathogènes d'*E. coli*, parfois en copie multiple semblent indiquer que ce système serait important pour la survie de ces espèces et la virulence des *E. coli* extra-intestinales (Figures 4 a-d, 11 et 12). Cette importance serait due à la versatilité dans le choix du substrat transporté du système SitABCD, capable de transporter le Mn^{2+} ou le Fe^{2+} et peut-être Zn^{2+} (Figures 6 et 7). En effet, les deux ions Mn^{2+} et Fe^{2+} transportés par SitABCD interviennent dans la réponse au stress oxydatif, si de plus il est confirmé que SitABCD transporte aussi Zn^{2+} , son rôle dans la survie de la cellule aux conditions de stress oxydatif sévère serait encore plus probable (Figure 11).

SitABCD et la résistance à la toxicité induite par H_2O_2 :

Mécanismes possibles de la contribution de SitABCD à la gestion du stress oxydatif : Dans le paragraphe portant sur les résultats du test de résistance à la toxicité induite par le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), nous avons fourni les données démontrant que la présence de l'opéron *sitABCD* améliorait la survie d'*E. coli* soumise au stress oxydatif (Figure 11). De plus, la région du promoteur de l'opéron *sitABCD* présente une séquence putative de liaison pour la protéine OxyR, régulateur global de la réponse au stress oxydatif généré par l'action du H_2O_2 et celle de liaison de SoxS, régulateur de réponse à l'action toxique de O_2^- (Figure 2) (132, 133). Il faut souligner que cette

séquence chevauche celle de MntR le répresseur de l'import de Mn^{2+} (86). Il nous paraît donc que le mécanisme de résistance au peroxyde d'hydrogène implique la dérégulation du transport de Mn^{2+} par la liaison de OxyR, inhibition concomitante de la liaison de MntR et expression accrue de l'opéron SitABCD. Il en va de même pour la séquence putative de liaison de SoxS.

Nous savons que SitABCD est exprimé par *S. flexneri* 2a à l'intérieur de la cellule hôte.(126) Nous savons aussi que l'accumulation du Mn^{2+} (jusqu'à des concentrations pouvant atteindre l'ordre du mmol) chez *Neisseria gonorrhoeae* protège la cellule du dommage dû au stress oxydatif (127). Il est possible qu'un mécanisme semblable soit à l'œuvre chez *E. coli* (62). Il faudrait donc procéder à des expériences de résistance au stress oxydatif du peroxyde d'hydrogène, mais aussi du superoxyde avec les mutants *sit*, *mntH*, *feoB* ou encore les combinaisons de ces mutations chez les souches dérivées de la souche χ 7122. Des expériences de régulation avec des fusions *lac* du promoteur de l'opéron *sitABCD* seraient aussi importants afin de définir le schéma de régulation de cet opéron et les stress à l'origine de son expression ou de son inhibition.

Résistance au stress oxydatif et pathogénicité : Il est connu que les cellules immunitaires utilisent le stress oxydatif en tant que moyen de contrôler les pathogènes potentiels. De plus, chez les bactéries aérobies ou aérotolescentes une activation du métabolisme qui pourrait être due à la lutte contre le système immunitaire, la nécessité d'exprimer des facteurs de virulence ou à une multiplication active au sein du site anatomique infecté s'accompagne souvent d'un stress oxydatif autogène. Ainsi, le succès de la pathogenèse implique, de la part du pathogène, la présence de mécanismes capables de gérer le stress oxydatif auto ou exogène. SitABCD pourrait faire partie de ces mécanismes. Il est donc souhaitable de procéder à des expériences portant sur les interactions entre les souches contenant l'opéron *sit* et les lignées cellulaires phagocytaires, afin de déterminer si *sit* ou *mntH* contribuent à la survie des bactéries lors de la phagocytose. Il est à noter que les souches sauvages APEC d'*E. coli*, évadent la phagocytose et survivent à l'action des phagocytes aviaires (70, 71). Le choix de la souche sera donc important pour ces expériences à venir.

Distribution de l'opéron *sitABCD* parmi les diverses souches d'*E. coli*

SitABCD et les souches extra-intestinales d'*E. coli* : Nous avons présenté les résultats concernant la distribution de l'opéron *sitABCD* parmi les souches d'*E. coli*. Comme le démontrent ces résultats, *sitABCD* est surtout présent chez les souches extra-intestinales d'*E. coli* que ce soient des souches humaines (ExPEC ou UPEC) ou aviaires (APEC) (Figures 11, et 12). Chez ces souches, *sitABCD* est soit porté par un plasmide (chez les APEC et quelques-unes des souches ExPEC) ou encore intégré dans le chromosome (ExPEC) (Figures 15 et 16). Cette prévalence marquée de *sitABCD* chez les souches pathogènes extra-intestinales est due à l'acquisition de l'opéron *sitABCD* à partir d'une source ancestrale et à la rétention de cet opéron ou sa distribution parmi ces souches sur un plasmide conjugatif.

L'opéron *sitABCD* d'*E. coli* provient du transfert horizontal par l'intermédiaire d'un plasmide conjugatif : En effet, la présence des séquences d'insertion autour de l'opéron *sitABCD* de la souche χ 7122 permet de supposer que l'opéron *sitABCD* s'est transposé dans le plasmide pAPEC-1, à partir d'une source inconnue. De plus, la similitude des séquences en 5' et 3' de l'opéron *sitABCD* avec le plasmide p1658/97 semble indiquer qu'un événement de transposition / recombinaison d'une région de p1658/97 dans le plasmide ancestral de pAPEC-1 a permis l'évolution de ce dernier vers sa forme actuelle (Figure. 1, Tableau 4).

Les souches humaines ont probablement intégré les éléments génétiques utiles, tels que le locus aérobactine et l'opéron *sitABCD*, à partir d'un plasmide de virulence homologue à pAPEC-1, soit directement par conjugaison du plasmide qui par la suite a été perdu par ces souches ou indirectement avec l'aide de phages qui auraient permis la transduction et l'intégration de régions génétiques provenant d'une autre souche ou même d'une autre espèce (29, 83). De plus, la présence de deux copies de *sitABCD*, une plasmidique et l'autre chromosomique, peut être envisagée en tant qu'étape intermédiaire dans l'évolution des souches humaines. Enfin, l'existence de souches qui contiennent deux copies chromosomiques de *sitABCD*, démontre que l'intégration de l'opéron *sitABCD* dans le chromosome a pu s'opérer plus d'une fois chez certaines souches

d'*E. coli*. Il serait d'ailleurs intéressant de comparer ces souches avec celles qui contiennent l'opéron *sitABCD* en copie unique sur le plan de la virulence et de résistance au stress oxydatif, afin de vérifier si ces souches retirent un avantage de la présence de *sitABCD* en plusieurs copies au sein de leur génome.

SitABCD et pathogénicité de la souche χ 7122 d'*E. coli* :

SitABCD intervient dans les étapes extra-intestinales de l'infection : L'opéron *sitABCD* est surtout distribué chez les souches extra-intestinales, que ce soit des souches uropathogènes ou celles qui, comme les APEC, peuvent causer la septicémie (Figures 11, 12). De plus, en ce qui concerne les souches APEC, la présence de l'opéron *sitABCD* apparaît corrélée avec la virulence (Figure 15). Il en résulte que c'est surtout chez ces souches que le système SitABCD trouve son application dans la survie à l'intérieur de l'organisme hôte et la virulence. Il nous paraît donc important de distinguer entre les deux types de résistance immunitaire responsables du contrôle des pathogènes intestinaux : avec intervention précoce de l'immunité humorale à IgA sécrétoires, et extra-intestinaux : immunité cellulaire par intervention précoce des neutrophiles et phagocytes (71, 72).

Le processus infectieux extra-intestinal prend de l'ampleur rapidement dans l'hôte susceptible en absence de l'immunité préalable. Les pathogènes extra-intestinaux doivent faire face à la première ligne de défense cellulaire. Or les principaux outils de cette défense sont la phagocytose et l'excrétion des produits toxiques d'oxygène et azote (131,132). La souche d'*E. coli* χ 7122 arrive à éviter la phagocytose et l'internalisation, donc même si chez *S. flexneri*, *sitABCD* est exprimé dans les cellules eucaryotes, il doit avoir un rôle même chez les bactéries et les souches (χ 7122 par exemple) dont le processus infectieux n'implique pas nécessairement de stade intracellulaire (71, 72, 97, 126).

SitABCD de χ 7122 est surtout important dans certains sites anatomiques : La prévalence élevée de l'opéron *sitABCD* chez les souches ExPEC et APEC, (Figure 12) dont certaines causant des infections systémiques avec un passage par la circulation sanguine associé à une bactériémie, semble indiquer que le système SitABCD est utile durant justement ces étapes du processus infectieux. De même, les résultats obtenus

lors d'une infection expérimentale dans un modèle aviaire semblent confirmer que SitABCD joue un rôle de première importance dans certains sites anatomiques dont les poumons, la rate et le sang (Figure 17). Il est à noter que le passage de la souche virulente par ces trois sites anatomiques met celle-ci en présence de nombreuses cellules phagocytaires.

Rôle possible de SitABCD : Nous suggérons que le système SitABCD joue un rôle dans la gestion de stress oxydatif lors de l'interaction entre le pathogène extra-intestinal et les cellules immunitaires. En effet, dans le cas où *sitABCD* serait un intervenant de la défense contre l'action des radicaux réactifs de l'oxygène ou de l'azote, que ce soit en important le Fe^{2+} en tant que cofacteur enzymatique pour la catalase ou la superoxyde dismutase (Fe-SOD) ou encore le Mn^{2+} pour son effet protecteur avec ou sans association avec la Mn-SOD, son rôle serait rempli autant à l'intérieur d'un phagocyte qu'à l'extérieur de celui-ci (107, 108, 131, 132). De plus, en ce qui concerne les bactéries et souches dont le cycle infectieux présuppose un stade à l'intérieur des cellules phagocytaires, le système SitABCD peut être en compétition avec les mécanismes de la cellule eucaryote pour l'acquisition des ions Fe^{2+} et Mn^{2+} en renforçant ainsi la résistance bactérienne à la toxicité des radicaux oxygénés et en affaiblissant les défenses de la cellule eucaryote, retournant ainsi en quelque sorte contre elle ses armes (9, 61). Des expériences d'infection intracellulaire avec des souches *sitABCD* positives et capables de résister aux effets de la phagocytose permettraient de vérifier si nos hypothèses sont fondées.

SitABCD est un facteur de virulence: Les caractéristiques de la région *sitABCD*, l'intervention du système SitABCD dans la résistance au stress oxydatif, l'association de l'opéron *sitABCD* avec les souches extra-intestinales et les souches APEC les plus virulentes, ainsi que l'influence de la mutation *sit* sur l'infection par la souche mutante dérivée de $\chi 7122$, nous permettent d'affirmer que l'opéron *sitABCD* est un facteur de virulence et que le système SitABCD est un déterminant de virulence chez certaines souches extra-intestinales d'*E. coli*.

IX Conclusion :

L'opéron *sitABCD* est largement représenté chez les souches d'*E. coli* tout en étant surtout prévalent chez les souches extra-intestinales pathogènes. Cet opéron qui peut être plasmidique ou chromosomique, encode un système de transport des ions métalliques divalents de type ABC dont les homologues sont conservés chez de multiples espèces bactériennes. SitABCD transporte avec une forte affinité les ions Mn^{2+} et Fe^{2+} , l'affinité de ce système pour le manganèse étant plus élevée que pour le fer. L'autre substrat ionique probable de SitABCD est le Zn^{2+} . L'expression de l'opéron *sitABCD* est sous le contrôle probable des protéines régulatrices qui limitent le transport de manganèse, fer et zinc. Les trois ions; Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} sont des cofacteurs enzymatiques connus des enzymes de défense contre le stress oxydatif. L'implication de SitABCD dans la gestion du stress oxydatif est confirmée par le résultat de nos expériences et son expression est probablement sous le contrôle des protéines régulatrices qui coordonnent la défense contre la toxicité de H_2O_2 et O_2^- . Lors de l'infection dans le système expérimental aviaire, SitABCD contribue à la survie de la souche APEC $\chi 7122$ dans certains sites anatomiques extra-intestinaux.

Toutes ces observations nous permettent de conclure que le système SitABCD est un facteur de virulence. Le rôle de ce système réside dans sa capacité d'importer de façon spécifique plusieurs substrats ioniques indispensables tant que cofacteurs des enzymes de la défense contre le stress oxydatif. Le système SitABCD est surtout important pour les étapes extra-intestinales du processus infectieux.

Le système SitABCD est donc un système dont l'étude est pertinente pour la compréhension de multiples aspects de la physiologie bactérienne en général et de la virulence en particulier. Ainsi SitABCD peut servir de modèle dans l'étude du fonctionnement des transporteurs ABC en général et des systèmes spécifiques des ions en particulier, ainsi que dans l'étude de la régulation du transport des ions métalliques et de la connexion entre ce transport et la gestion du stress oxydatif et enfin dans l'étude des mécanismes impliquant le transport des ions métalliques et la gestion du stress oxydatif lors de l'infection bactérienne. Nous espérons développer des projets afin d'explorer les aspects cités lors d'études expérimentales à venir et de contribuer ainsi à une meilleure compréhension de la pathogenèse bactérienne.

X Contribution de l'étudiant et autres apports ayant mené à ce mémoire:

J'ai pu contribuer à la réalisation de ce projet en procédant à l'identification des cosmides portant l'opéron *sitABCD* dans la banque cosmidique des séquences non-K-12 de χ 7122, au clonage de la région *sitABCD* de χ 7122 donnant ainsi le plasmide pIJ28 et à l'amplification et clonage de l'opéron *sitABCD* de CFT073 aboutissant au plasmide pIJ5. J'ai utilisé ces plasmides pour transformer les souches mutantes appropriées, dont la souche mutante *mntH* dont j'ai réalisé la construction, afin de procéder aux tests de croissance en milieu pauvre en fer, au test de résistance au peroxyde d'hydrogène et aux tests de transport de Fe^{2+} et Mn^{2+} . J'ai aussi apporté une modeste contribution lors du séquençage de la région de l'opéron *sitABCD*. Enfin j'ai réalisé l'analyse des données pour les figures de ce mémoire, sauf si autrement spécifié.

Je tiens à remercier chaleureusement ma collègue de laboratoire Maria Loumberopoulou pour le criblage des souches d'*E. coli* par PCR multiplex, l'équipe de Maryvonne Moulin-Schouleur (INRA, Tours, France) pour le criblage des souches APEC et Simon Léveillé pour le criblage des souches ExPEC par transfert Southern et la construction de la souche mutante QT205, Δ *sitABCD* ::*tetAR*.. Je remercie ma collègue Mélissa Caza et mon directeur de recherche Charles Dozois qui ont réalisé les tests d'infection dans le modèle expérimental aviaire et le Dr R. Curtiss III (Washington Univ. St-Louis Mo, USA) qui a pu accueillir les membres de notre groupe pour procéder à ces tests. Le Dr J.R. Johnson (Veterans Affairs Medical Center, Minneapolis, Mn, USA) pour nous avoir fourni diverses souches d'*E. coli*, dont la collection ECOR. Le Dr K Hantke (Universitat Tubingen, Tubingen, Allemagne) pour nous avoir fourni certaines souches mutantes d'*E. coli* K-12 dont H1771 et le Dr R D Perry (University of Kentucky, Lexington, USA) qui nous a fourni la souche mutante 1017. Je remercie encore C. Dozois pour son aide dans le séquençage de la région *sit*, l'assemblage des contigs de cette région, l'analyse des caractéristiques de la séquence finale obtenue et évidemment pour la correction préliminaire de ce mémoire.

Annexe I

Tableaux et Figures

Tableau 1 : Souches utilisées dans cette étude :

Souches :	Génotype :	Plasmides :	Résistance :	Rôle:	Références :
χ 7122	Souche pathogène aviaire	pAPEC-1 pAPEC-2 pAPEC-3	Nal	Souche modèle lors des infections expérimentales, sert de base à la création des mutants	Provence, 1992
χ 7274	Dérivé de χ 7122 ayant perdu pAPEC-1	pAPEC-2 pAPEC-3	Nal	Éliminer les systèmes présents sur pAPEC-1	Dozois 2000
χ 289	Type sauvage d' <i>E. coli</i> K12			Type sauvage non-virulent sans SitABCD	Brown, 1996
QT99	χ 289 mais <i>mntH::kan</i>		Kan	mutant <i>mntH</i> transport de Mn ²⁺ déficient	Cette étude
QT100	QT99 mais <i>sit+</i>	pIJ28	Kan Cm	mutant <i>mntH</i> complémenté par <i>sitABCD</i>	Cette étude
QT101	QT99 mais <i>mntH+</i>	pIJ42	Kan Cm	mutant <i>mntH</i> complémenté par <i>mntH</i>	Cette étude
QT102	QT99 mais pACYC184	pACYC184	Cm Tet	mutant <i>mntH</i> contrôle vecteur (négatif)	Chang, 1978 (plasmide)
H1771	<i>feoB</i> , <i>aro</i>		Kan	mutant <i>feoB</i> et <i>aro</i> , transport de Fe ²⁺ déficient	Kammler, 1993
QT108	H1771 mais <i>sit+</i>	pIJ28	Kan Cm	mutant <i>feoB</i> et <i>aro</i> complémenté par <i>sitABCD</i>	Cette étude
QT109	H1771 mais <i>mntH+</i>	pIJ42	Kan Cm	mutant <i>feoB</i> et <i>aro</i> complémenté par <i>mntH</i>	Cette étude
QT100	H1771 mais pACYC184	pACYC184	Kan, Cm, Tet	mutant <i>feoB</i> contrôle vecteur	Chang, 1978 (plasmide)
1017	HB101 mais <i>ent</i>		Kan	Mutant <i>ent</i> entérobactine déficient Croissance affectée dans un milieu pauvre en fer	Daskaleros, 1991
QT113	1017 mais <i>sit+</i>	pIJ28	Kan Cm	mutant <i>ent</i> complémenté par <i>sitABCD</i>	Cette étude
QT114	1017 mais aérobactine+	pABN1	Kan Am	mutant <i>ent</i> complémenté par l'aérobactine, contrôle positif pour croissance en milieu appauvri en fer	Bindereif, 1983 (plasmide)
QT115	1017 mais pACYC184	pACYC184	Kan, Cm Tet	mutant <i>ent</i> contrôle vecteur	Chang, 1978 (plasmide)
QT205	χ 7122 mais <i>sit</i>	pAPEC-1 pAPEC-2 pAPEC-3	Nal	Mutant <i>sit</i> de la souche virulente pour les infections expérimentales et les tests impliquant le système <i>sit</i>	Cette étude

Tableau 2 : Plasmides utilisés dans cette étude

Plasmides:	Vecteur:	Résistance	Site de clonage	Insert:	Rôle:	Référence
Cosmides	SuperCos	Ap	<i>Not</i> I	Banque génomique d'inserts de χ 7122	Identification des séquences uniques de χ 7122	Wahl G,M 1987
pIJ5	pWSK29 (Wang, 1991)	Kan	<i>Hind</i> III	fragment <i>Hind</i> III de 4,3 kb d'un amplicon de PCR de <i>sitABCD</i> de la souche CFT073	Expression du système <i>SitABCD</i> de CFT073	Cette étude
pIJ28	pACYC184 Chang, 1978	Cm	<i>Hind</i> III	fragment <i>Hind</i> III de 8,5 kb de l'insert du cosmide C6 comprenant l'opéron <i>sitABCD</i> of χ 7122	Expression du système <i>SitABCD</i> de χ 7122	Cette étude
pIJ42	pACYC184 Chang, 1978	Cm	<i>Hind</i> III	fragment <i>Hind</i> III de 1,9 kb d'un amplicon de PCR du gène <i>mntH</i> de χ 7122	Expression du transporteur <i>MntH</i> de χ 7122	Cette étude
pABN1	pPLAC	Ap		Opéron aérobactine cloné du plasmide pColV-K30	Expression du locus de synthèse et du récepteur de l'aérobactine	Bindreif A 1983
pIJ43	PIJ5	Kan	<i>Pst</i> I	opéron <i>sitABCD</i> interrompu par la cassette de résistance <i>tetAR(B)</i> de pYA3442 (Dozois 2000)	Étape intermédiaire de production du vecteur d'échange allélique	Cette étude
pIJ44	PMEG-375 (Dozois 2000)	Cm, Ap	<i>Bss</i> H II	opéron <i>sitABCD</i> interrompu par une cassette de résistance <i>tetAR(B)</i> sous clonée de pIJ43	Échange allélique, mutagenèse <i>sit</i>	Cette étude

Tableau 3: Amorces PCR utilisées dans notre étude :

Oligo	Séquence	Utilisé pour	Cible
CMD-20	aaaagcttaagacgacaatcgtcggga	clonage de la région <i>sit</i> d' <i>E.coli</i> 4038kb	<i>sitD</i>
CMD-21	ttgagctcggataacgcttaccgtgtaa	idem	Début operon <i>sit</i>
CMD-22	ccctgtaccagcgtactgg	criblage de <i>sitA</i> chez <i>E.coli</i> 663pb	<i>sitA</i>
CMD-23	cgcagggggcacaactgat	idem	idem
CMD-24	aaaagcttttgcctgtgccggtggg	voir <i>sitD</i>	remplace <i>sit D</i>
CMD-41	gcggtgtgcaggagtacc	criblage <i>sitD</i>	<i>sitD</i>
CMD-42	ctgtgcctgctgtcggc	idem	<i>sitD</i>
CMD-43	ctatgttttagaggcacaagatgacgaactatcgcgtgtaggctggagctgcttc	KO <i>mntH</i>	<i>mntH</i>
CMD-44	tagtgccaratgcgacgctcattcaactacaatcccatatgaatatcctccttag	idem	<i>mntH</i>
CMD-45	tacgatttaggtgacactatag	séquençage des cosmides	SP6
CMD-46	gtaatacgaactactataggg	idem	T7
CMD-58	ggttaagctccgtgcacattctatgtaa	1608 wt 1960 muté	<i>mntH</i> criblage et clonage
CMD-59	ctaagcttcglagggcgataaggcgtt	séquençage	idem
CMD-65	gttacagcaattatgagcaggcgg	idem	<i>sitC</i>
CMD-66	gtgctactggaaccttcagctat	idem	<i>sitB</i>
CMD-67	tcagagcattatctggcgacatcc	idem	<i>sitA</i>
CMD-68	caggtaagcggttgcatacagaga	idem	<i>sitD</i>
CMD-69	ctttaagcttccgtgcacattctatgt	criblage	<i>mntH</i>
CMD-70	ctctaagcttcgtagggcgataaggcgt	idem	<i>mntH</i>
CMD-80	tcatacgataagctttaatgcggttag	séquençage	pACYC184 S
CMD-81	tcagagcaagagatcgcgcagac	idem	pACYC- <i>XbaI</i>
CMD-83	gtcattccgacagcatcgccagtcact	idem	pACYC- <i>EcoRV</i>
CMD-84	ggctttgacgtctgtactgtttcac	idem	pIJ28end
CMD-85	attggcaagttctctaggacgcag	idem	<i>sitA</i> +
CMD-86	cgatttgcgaagatgtgacaacgc	idem	<i>sitD</i> +

Tableau 4 : Caractéristiques des gènes putatifs de la région *sitABCD* :

Gène putatif	Position (pb)	Taille du produit (aa)	Homologie (% identité % similarité)	Fonction	Région d'identité	Contenu GC %	no. Accès
ImpB^d	3>341	112	ImpB (100) <i>E. coli</i> plasmide p1658/97	Protection UV	9>341	56	AAO49621
InsB	521<1024	167	InsB <i>E. coli</i> plasmide p1658/97	Transposase IS1	Pleine longueur	47	AAO49620
InsA	943<1218	91	InsA <i>E. coli</i> plasmide p1658/97	Transposase IS1	Pleine longueur	52	AAO49619
SitA	1574>2488	304	SitA (98) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Protéine périplasmique de liaison	Pleine longueur	52	AAM95574
SitB	2488>3315	275	SitB (98/99) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Composante de liaison ATP	Pleine longueur	49	AAM95575
SitC	3312>4169	285	SitC (99) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Composante de la membrane interne	Pleine longueur	48	AAM95576
SitD	4166>5023	285	SitD (96/98) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Composante de la membrane interne	Pleine longueur	42	AAM95577
Eno-2	5492>5926	144	Eno-2 (69/85) <i>Pseudomonas syringae</i>	Énolase putative	5514>5921	61	NP_794367
CrcB	6268>6648	126	CrcB (52/72) <i>Nitrosomonas europaea</i>	Rôle putatif dans la condensation du chromosome	Pleine longueur		CAD85615
ShiF							

Tableau 5: Les protéines les plus homologues à SitABCD chez les autres bactéries

Espèces Bactériennes (système)	% identité / %similarité aux composants prédits d' <i>E. coli</i> χ 7122				no. d'accès
	SitA	SitB	SitC	SitD	
<i>Salmonella enterica</i> (SitABCD)	70.3 / 82.4	75.6 / 84.0	84.6 / 90.9	64.4 / 81.3	AAD41065- AAD41068
<i>Sinorhizobium meliloti</i> (SitABCD)	63.7 / 77.1	62.4 / 71.1	78.0 / 89.5	57.6 / 74.3	CAC47605-CAC47608
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> (SitABCD)	59.9 / 76.0	61.0 / 74.3	76.2 / 88.1	52.1 / 73.3	AAL45262-AAL45265
<i>Yersinia pestis</i> (YfeABCD)	57.9 / 73.6	57.1 / 72.6	63.9 / 79.3	48.5 / 69.4	Q56952-Q56955

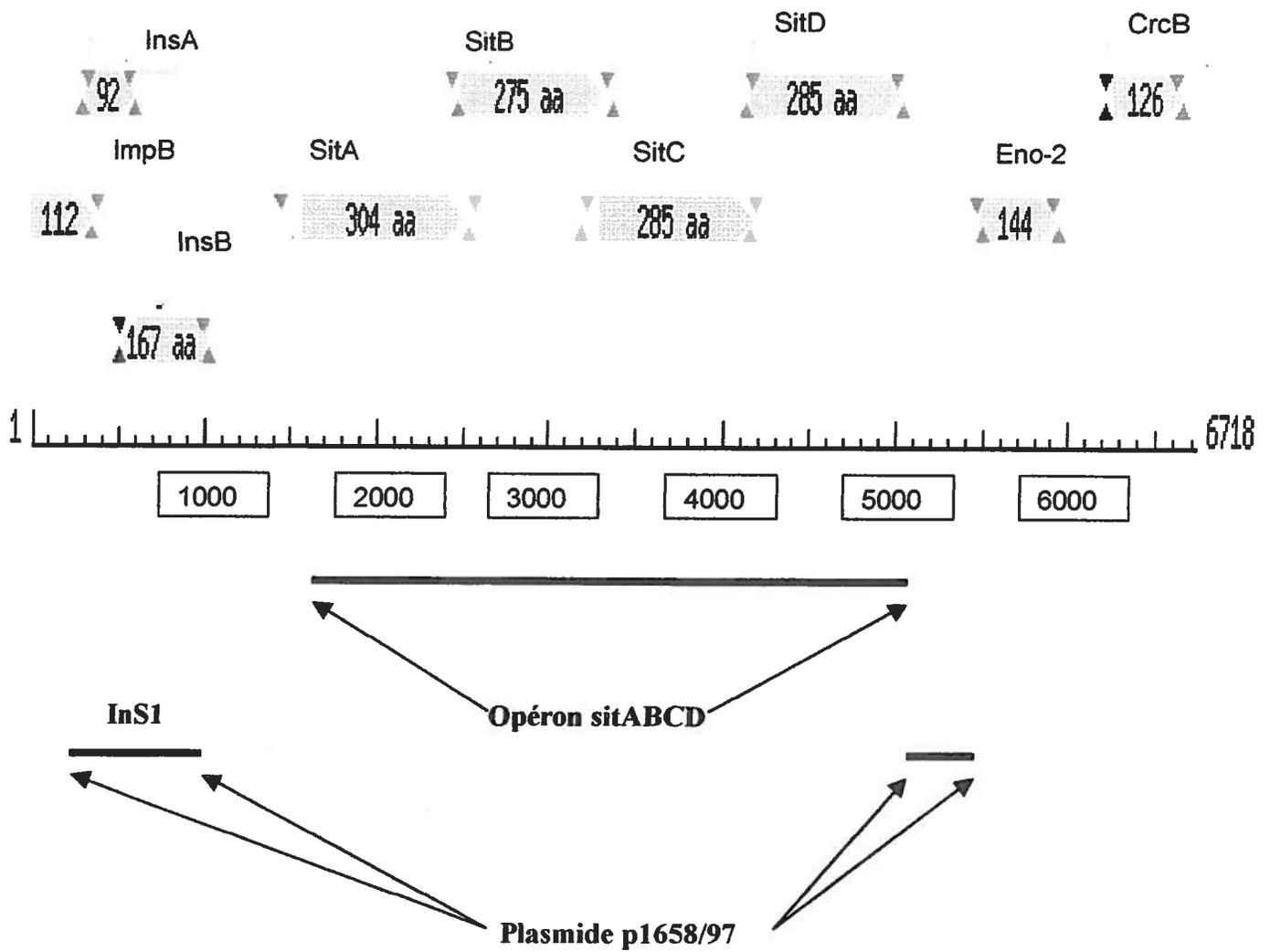


Figure 1 Les gènes putatifs dans la région *sitABCD* de χ 7122

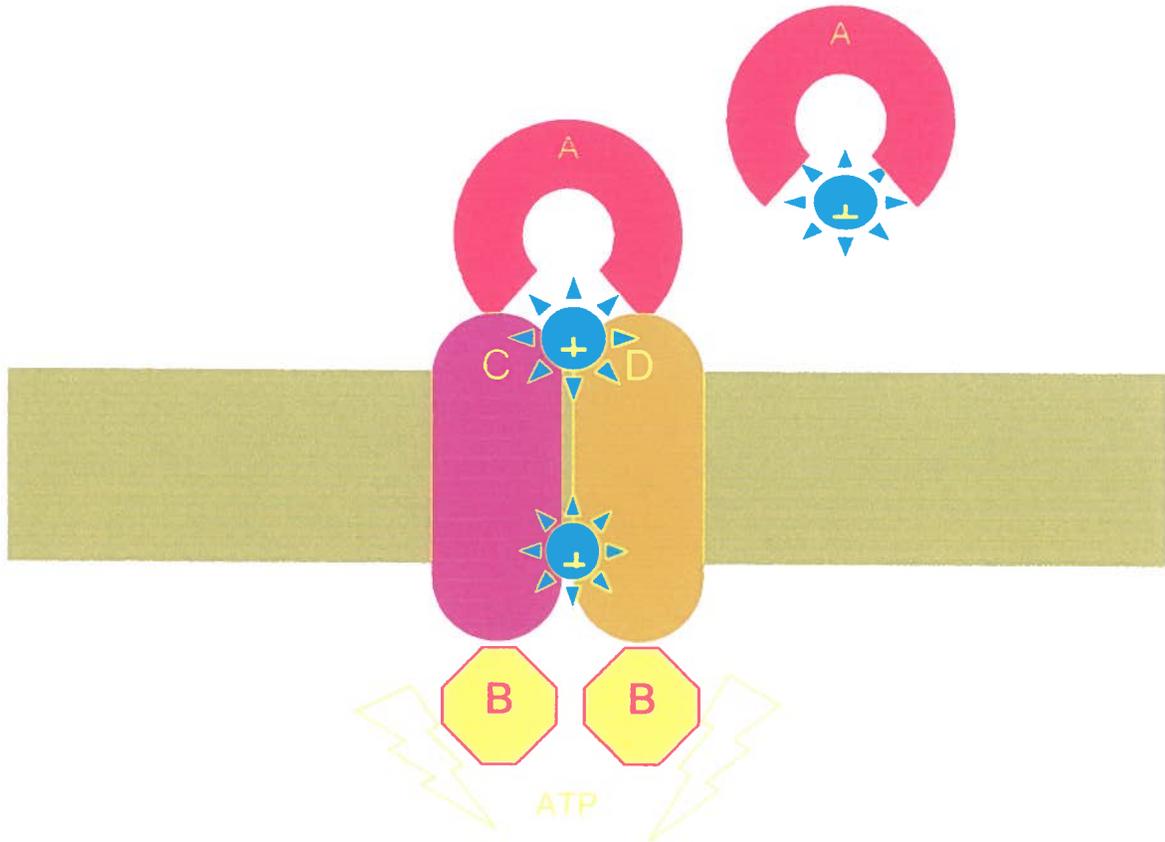
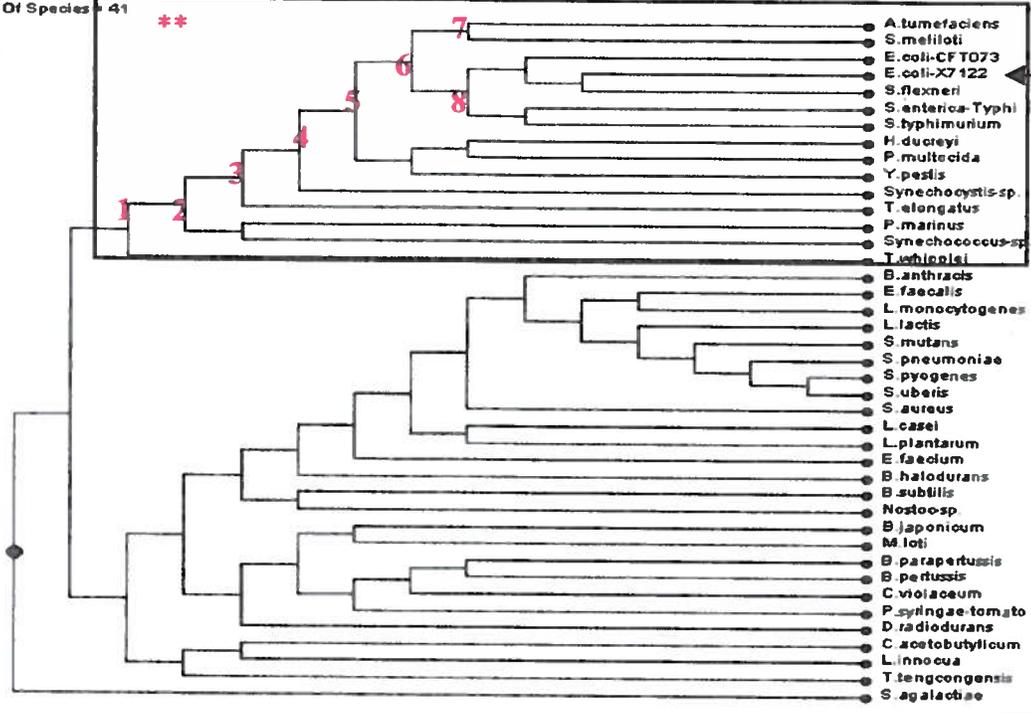


Figure 3 : Mode probable d'action du système Sit: SitA capte un ion dans le périplasma, le transfère à SitC+SitD (canal transmembranaire) qui énérgisés par l'ATP-ase SitB permettent le passage de l'ion à travers la membrane interne dans le cytoplasme.

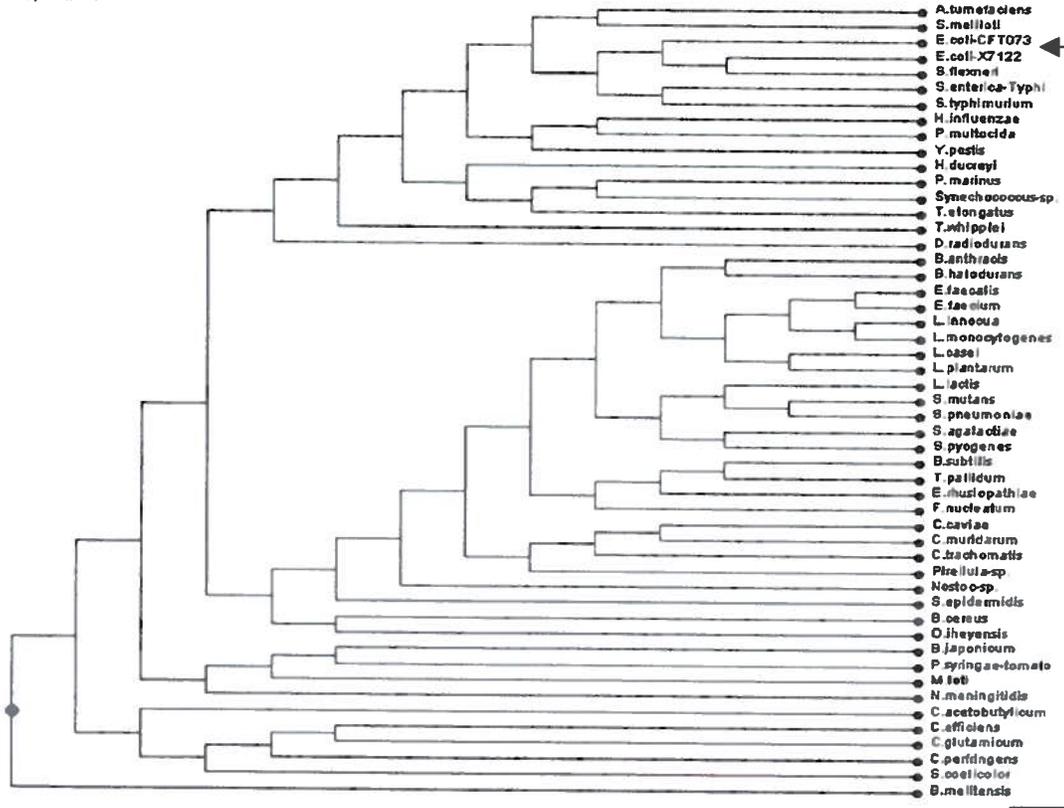
**** Homologues les plus proches de SitABCD**

C:\WINDOWS\Desktop\Mo. SitA tree .bt
Number Of Species = 41



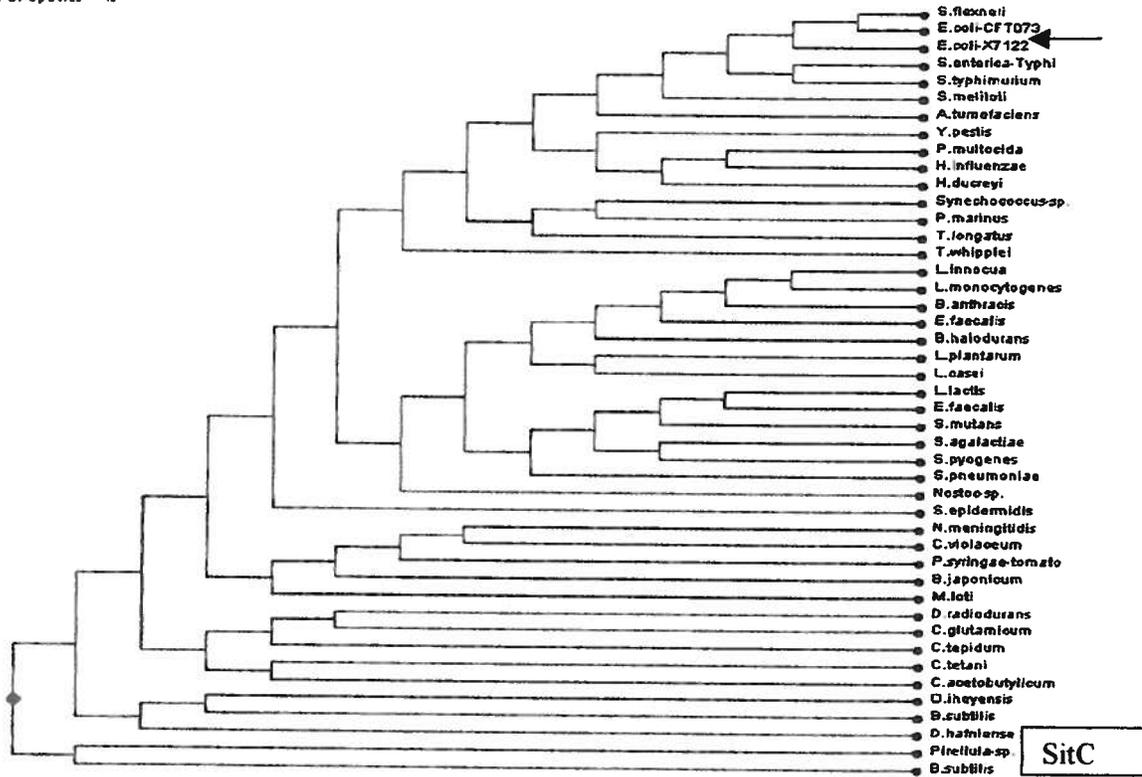
SitA

C:\WINDOWS\Desktop\Mo. SitB tree .bt
Number Of Species = 51



SitB

C:\WINDOWS\Desktop\Mo listC tree.t
 Number Of Species = 45



C:\WINDOWS\Desktop\Mo listD tree.t
 Number Of Species = 45

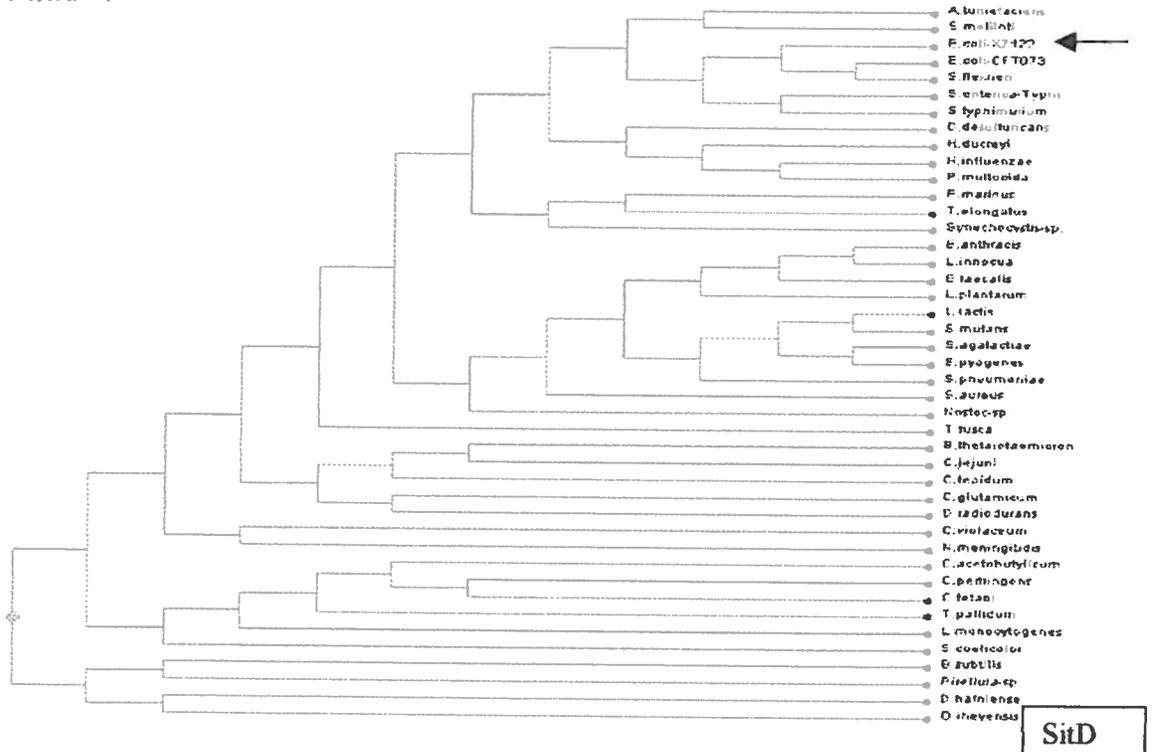


Figure 4 a-d Arbres phylogénétiques des homologues des protéines du systèmes *Sit*

SitABCD permet la croissance de la souche 1017 mutante *ent* dans un milieu appauvri en fer

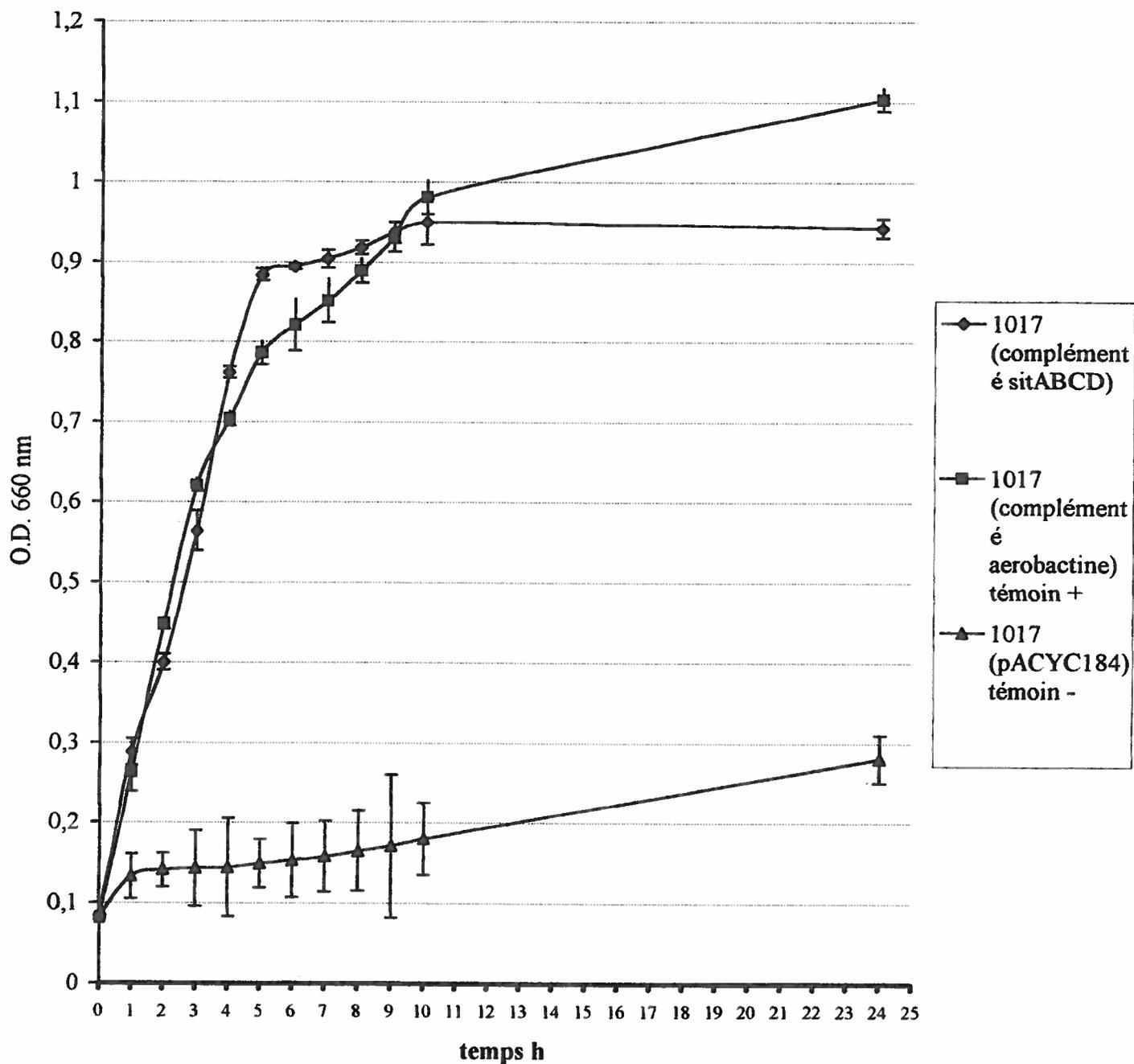


Figure 5: Restauration de la croissance de la souche mutante *ent* 1017 dans un milieu appauvri en fer par SitABCD

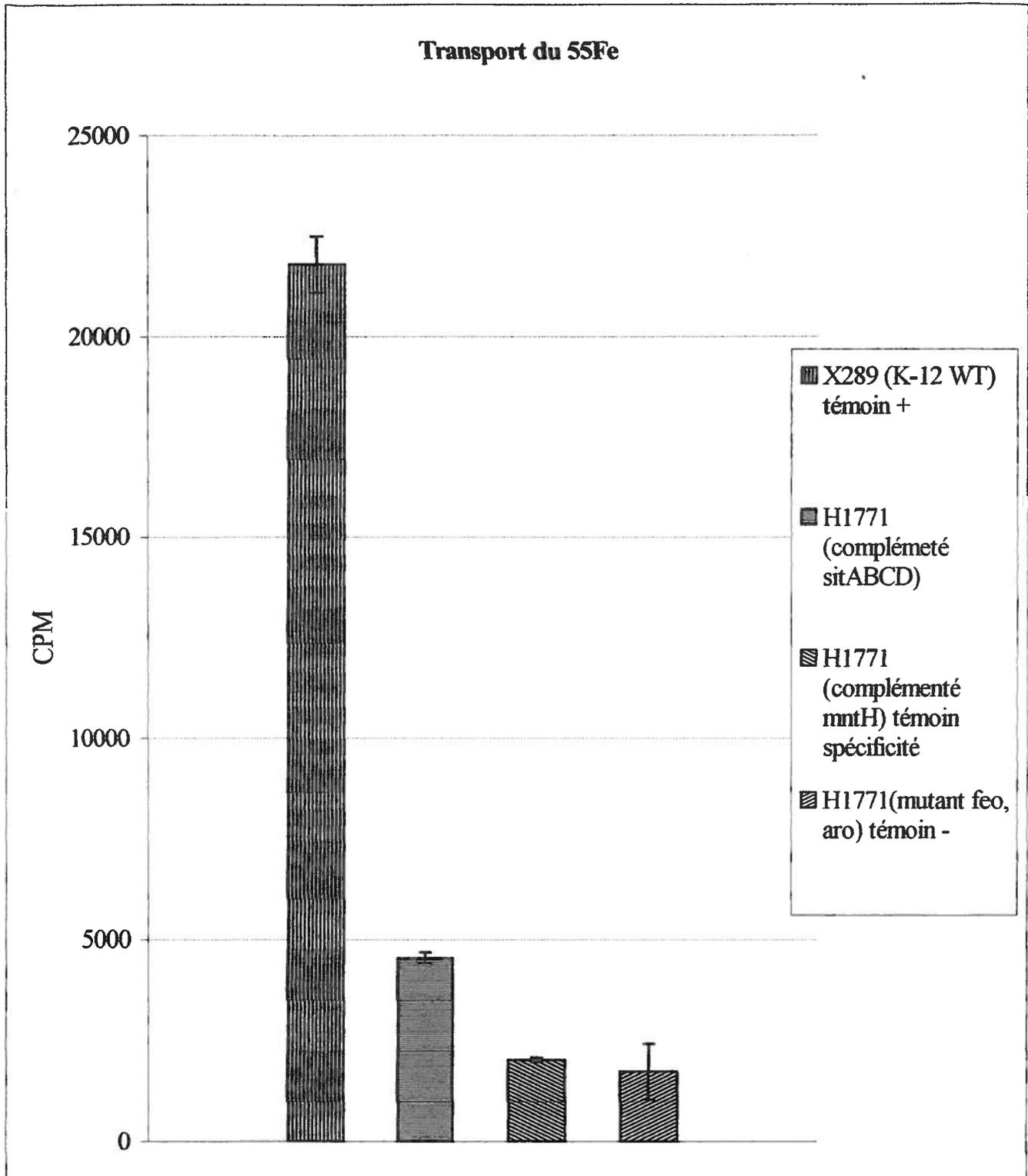


Figure 6: Transport du fer par SitABCD

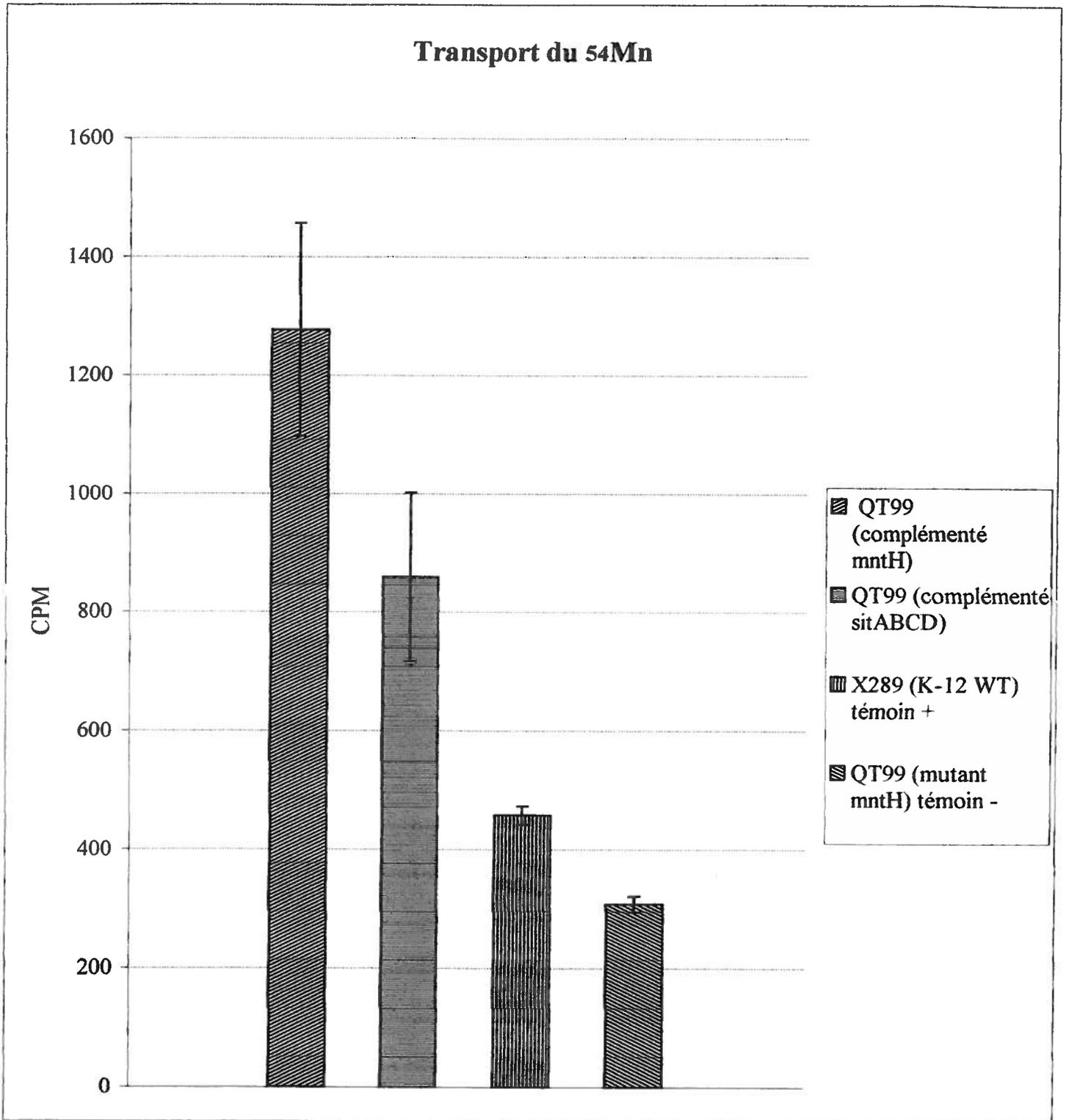


Figure 7: Transport du manganèse par SitABCD

MntH est le transporteur dominant de Mn²⁺ chez *E.coli* χ 7122

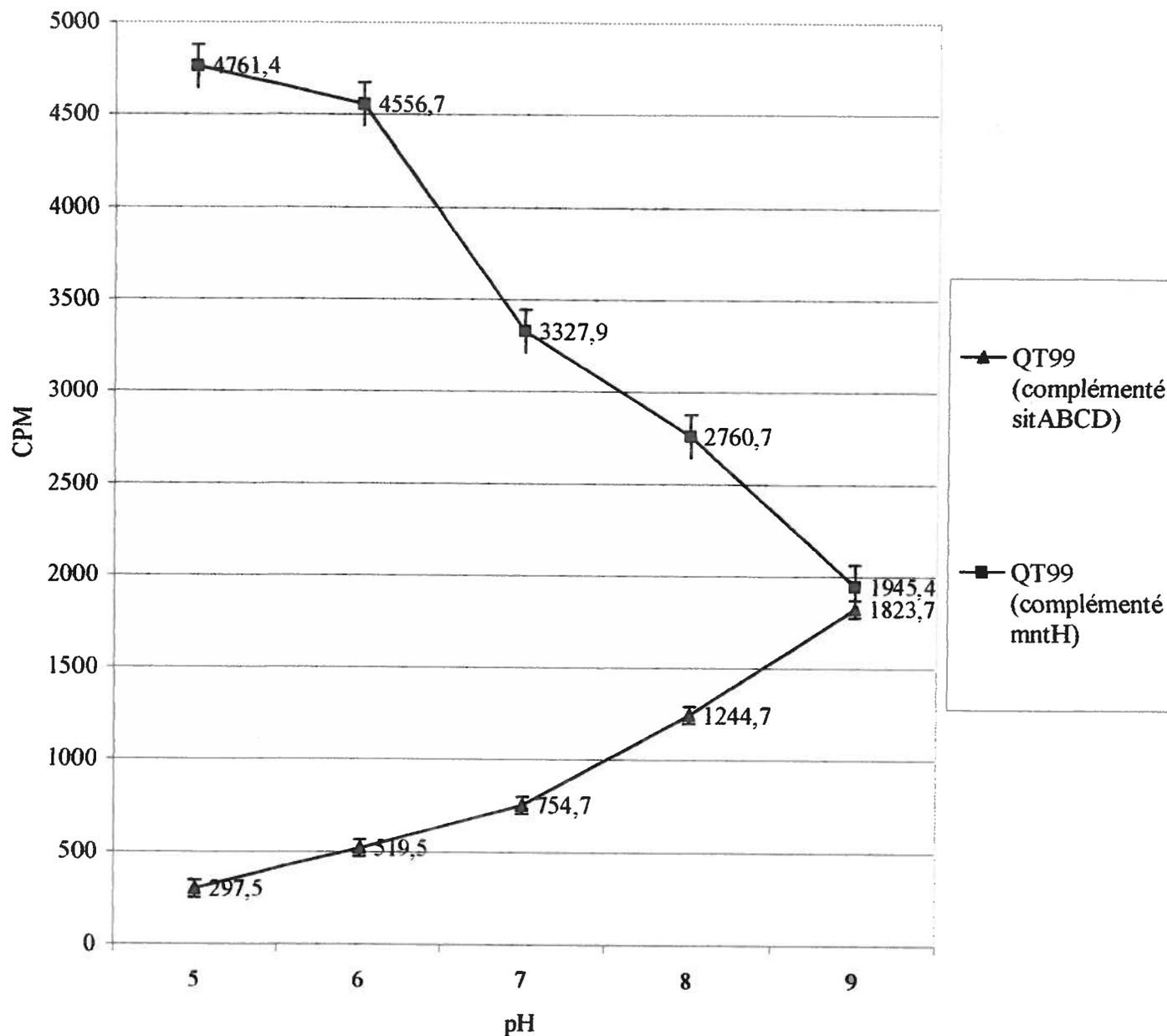


Figure 8 : Transport du Mn à pH différent par sitABCD et MntH

Transport de $^{55}\text{Mn}^{++}$

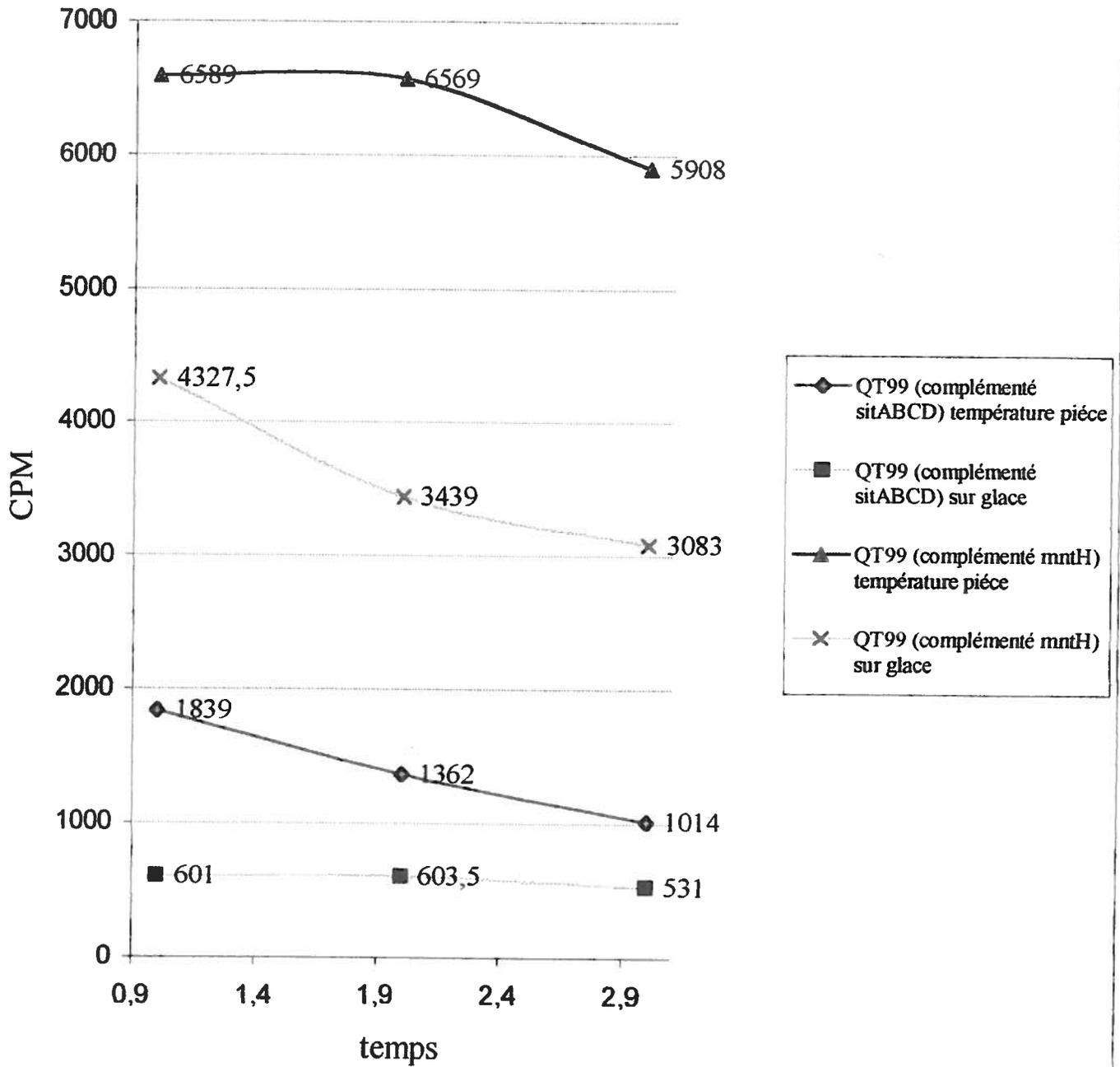


Figure 9 : Transport actif de Mn^{2+} par SitABCD

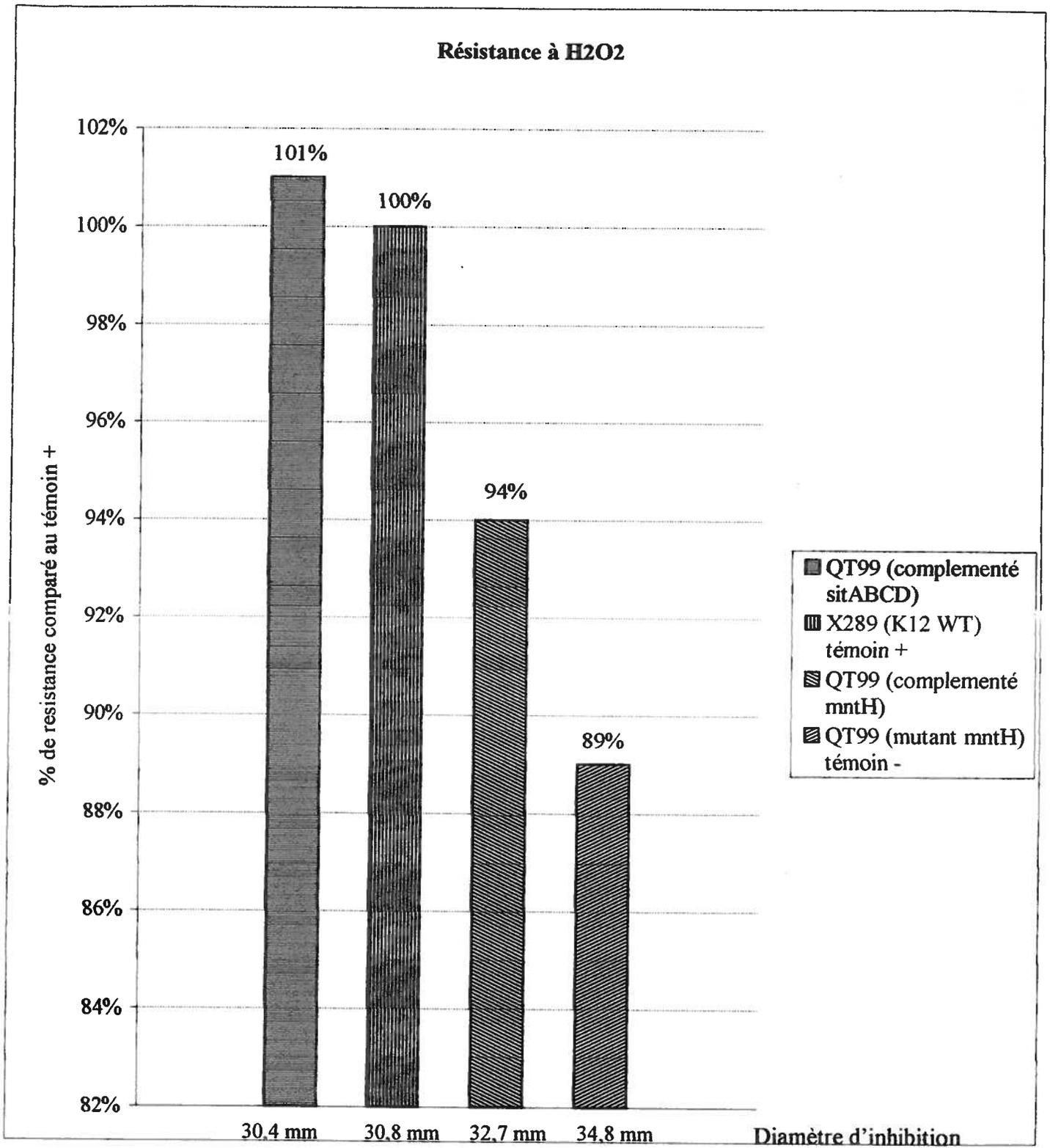


Figure 10 : Implication de SitABCD dans la résistance au stress oxydatif

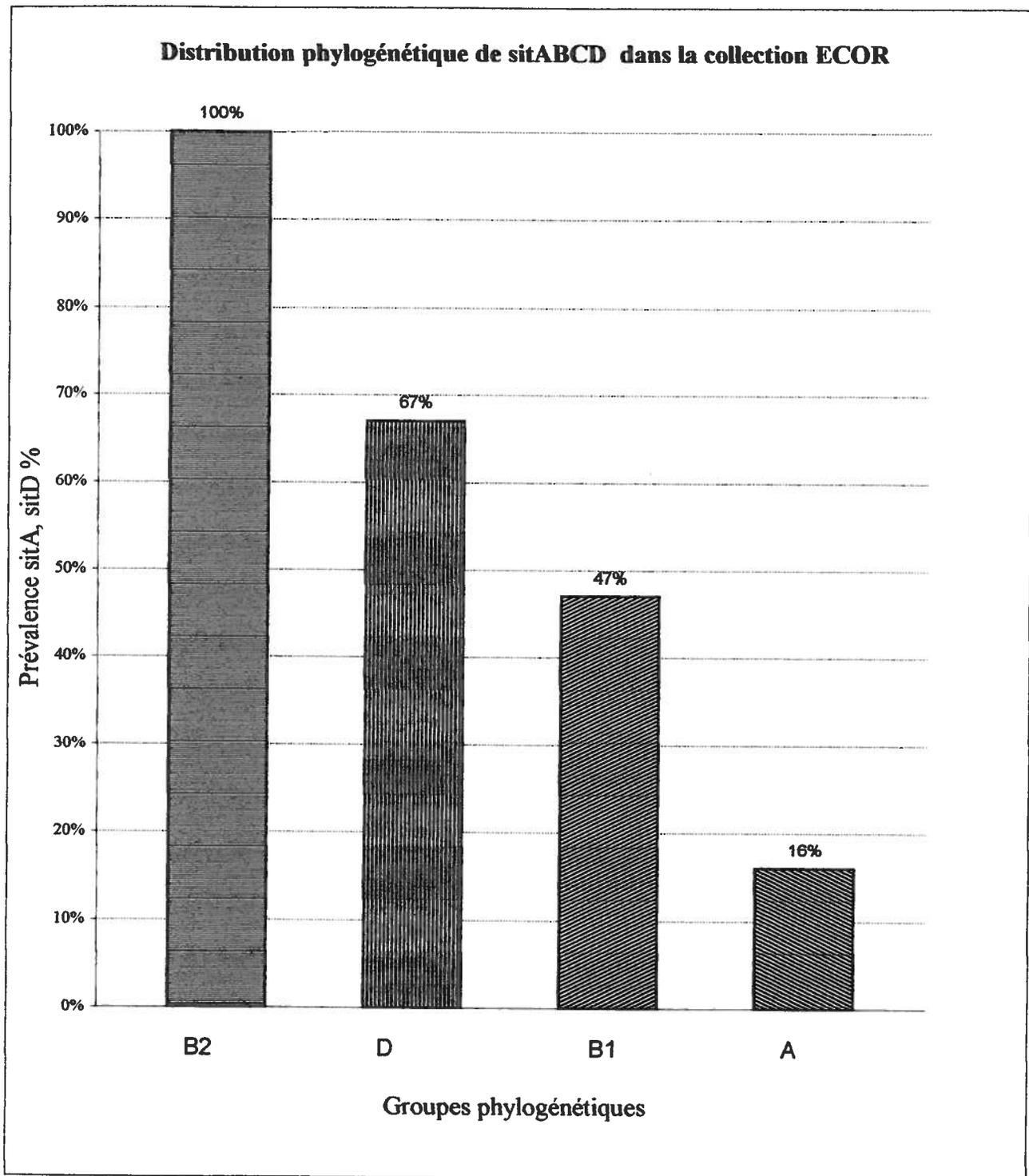


Figure 11: Prévalence de l'opéron *sitABCD* parmi les *E. coli* de la collection ECOR

La prévalence de l'opéron *sitABCD* dans différentes populations de *E. coli*

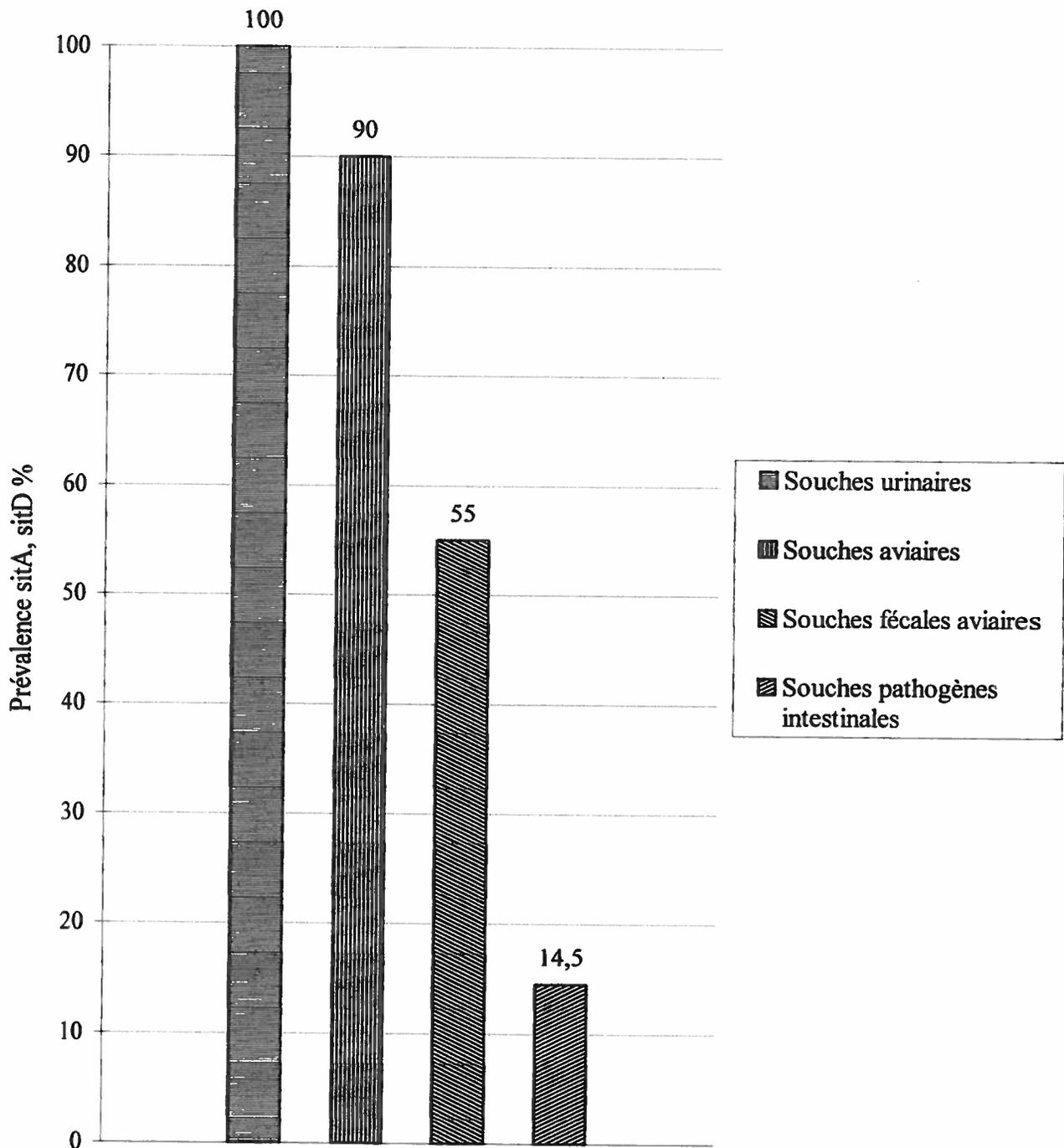


Figure 12 : Prévalence de *sitABCD* chez les isolats d'*E. coli* des différents milieux

Prévalence de *sit* dans les différents sérogroupes

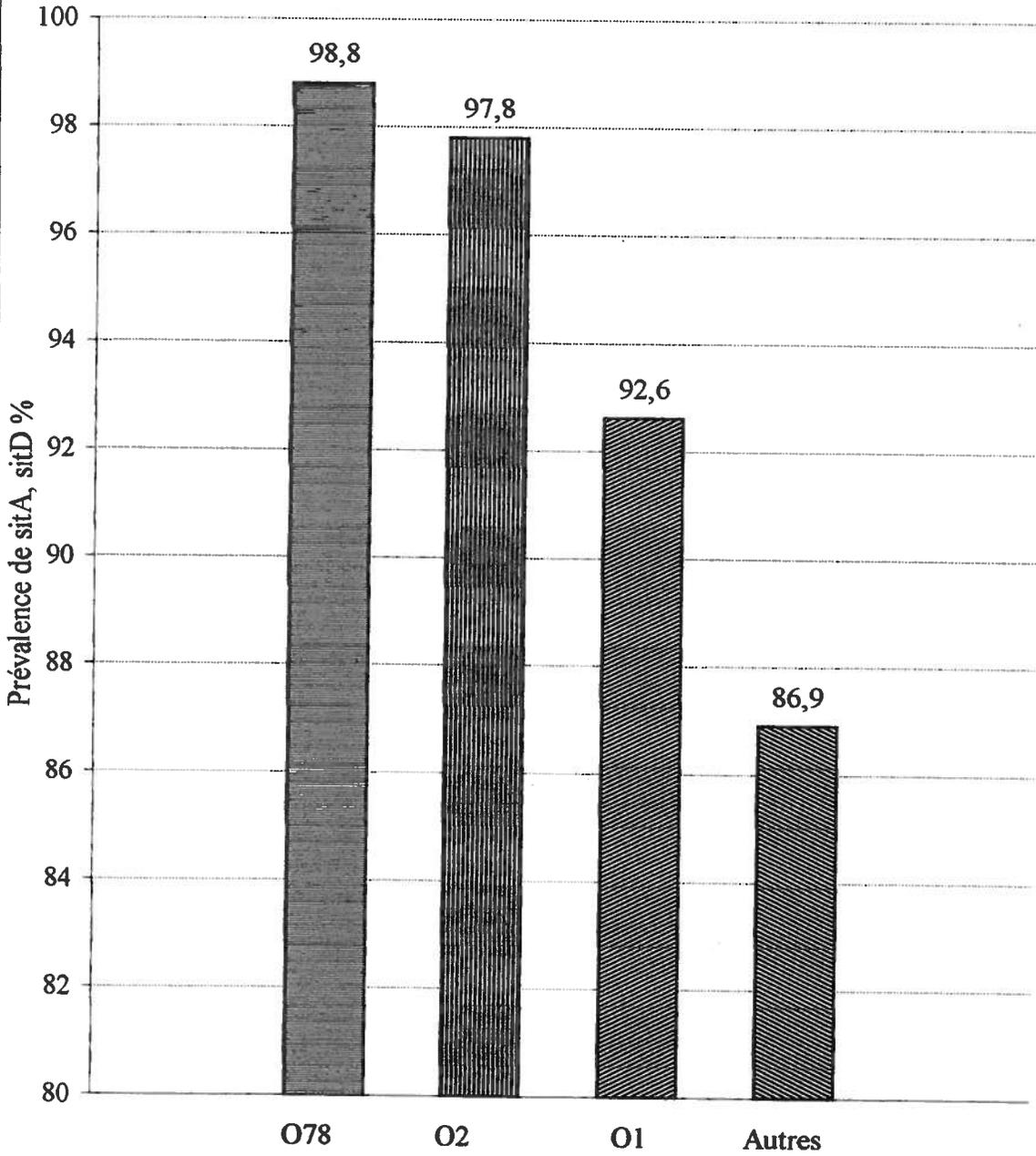


Figure 13 Prévalence de *sitABCD* dans les différents serotypes d'*E. coli*

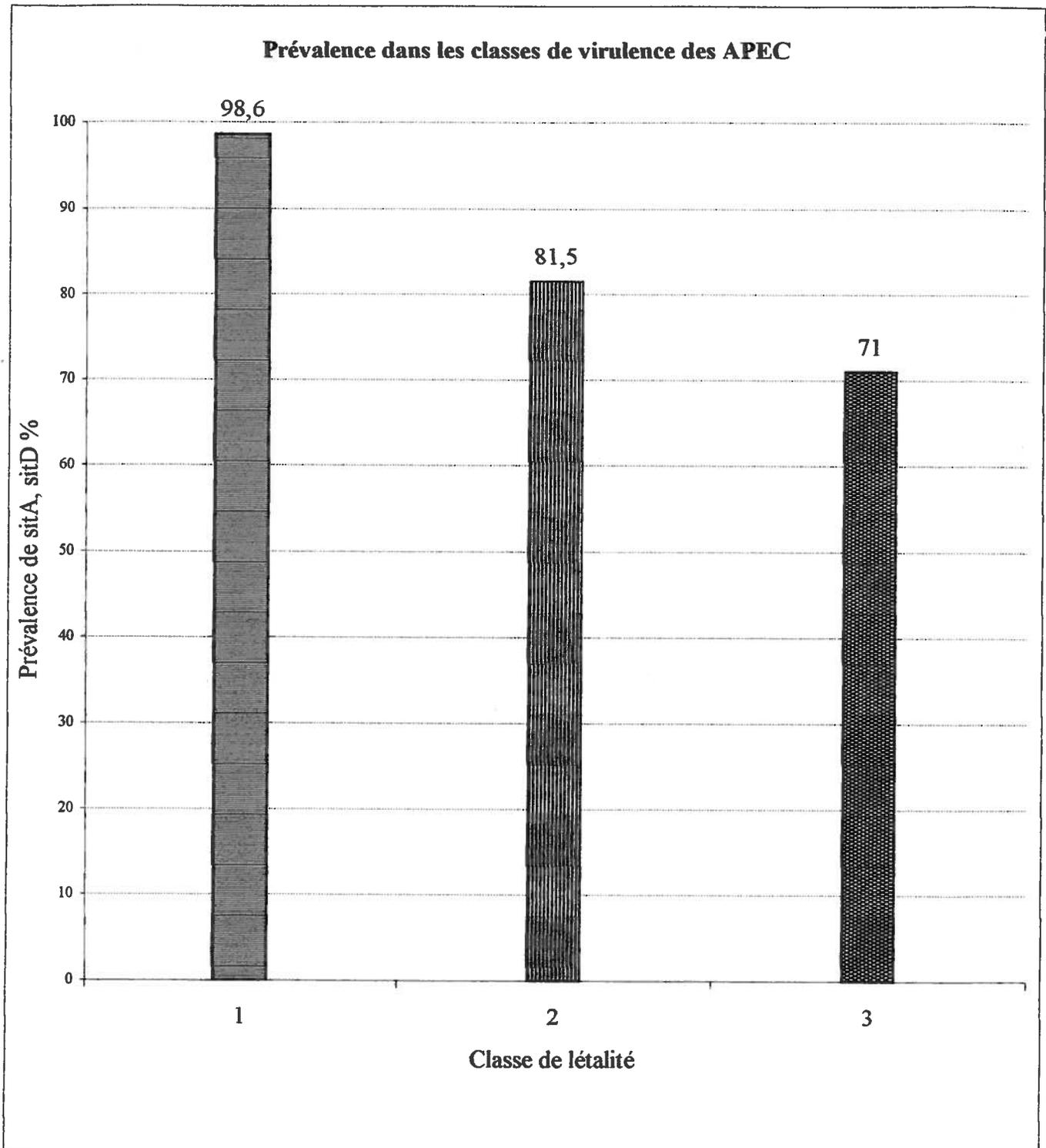


Figure 14: Prévalence de *sitABCD* est associée à la létalité des souches APEC

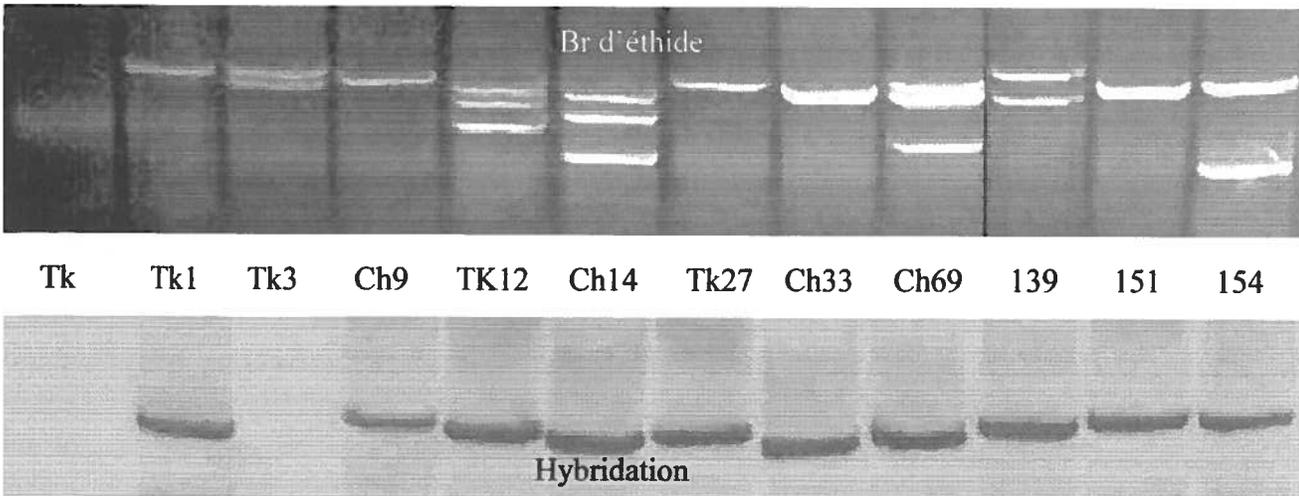
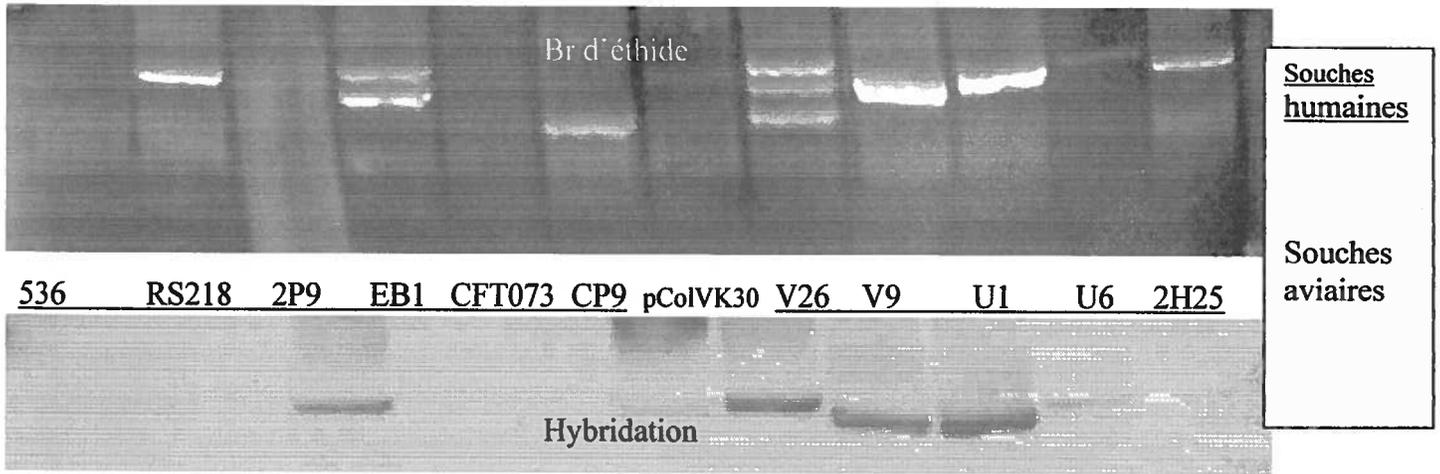
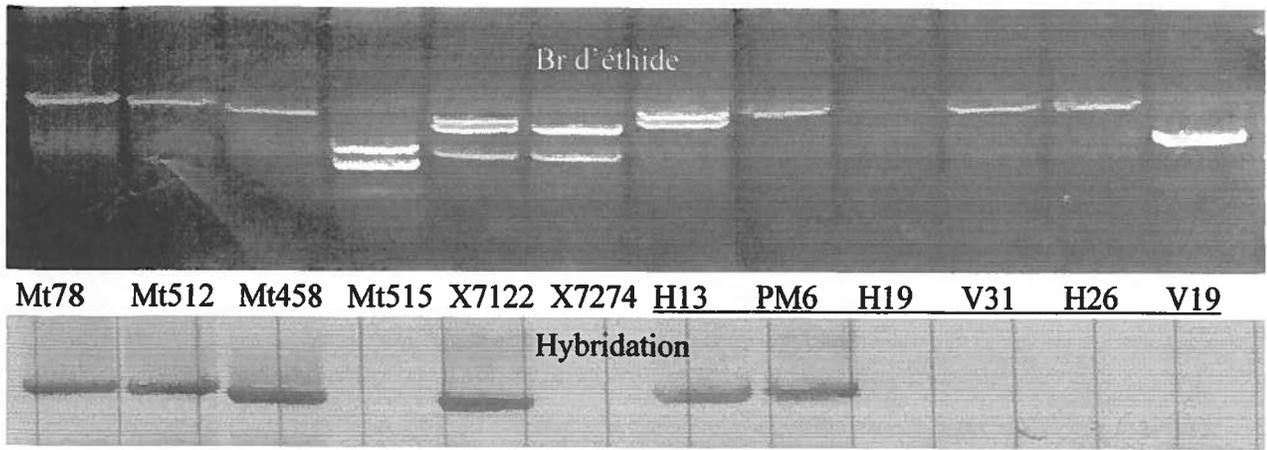


Figure 15: Profils plasmidiques des souches d'*E. coli* et hybridation Southern des plasmides avec une sonde *sitA*

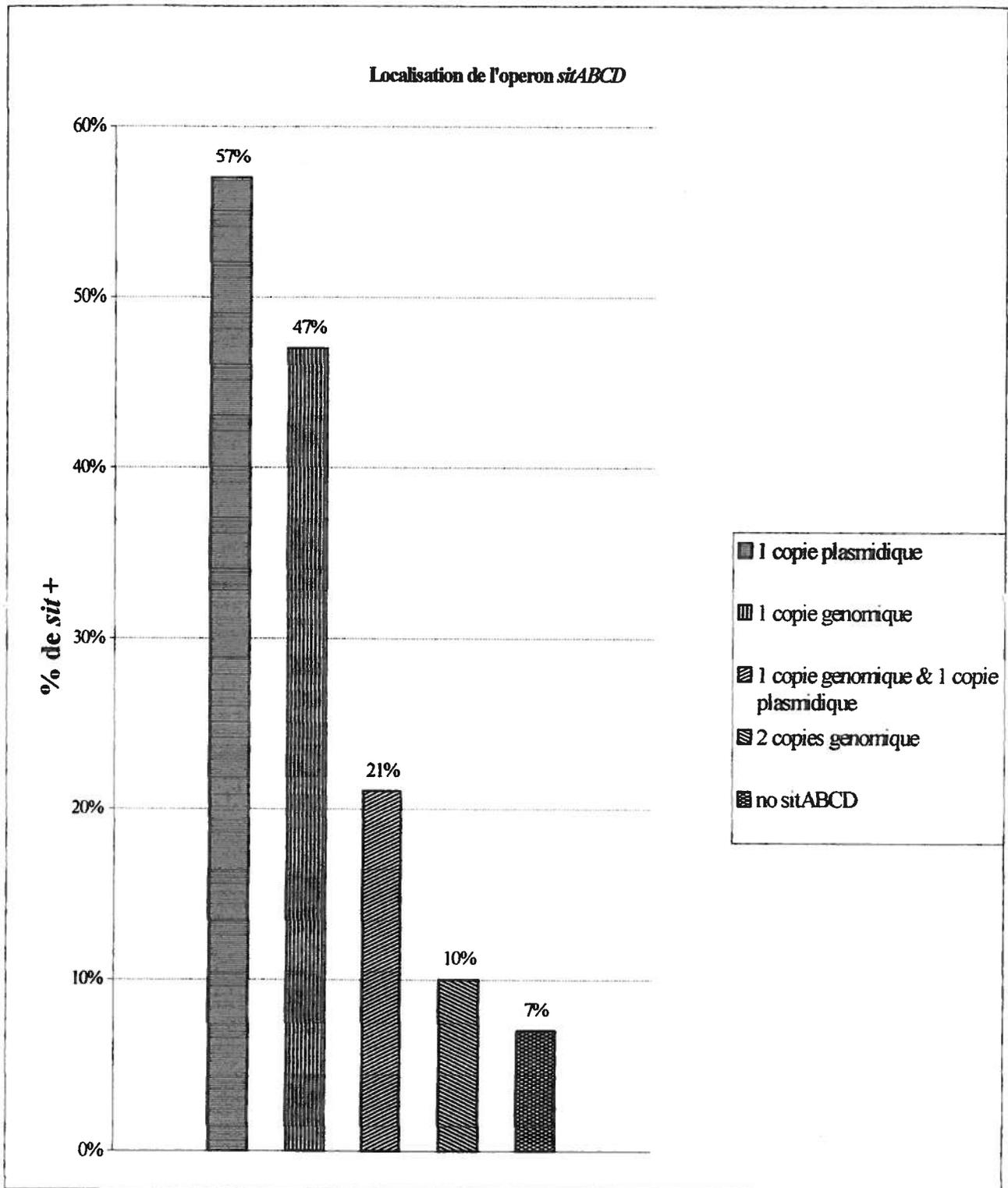


Figure 16: La localisation de l'operon *sitABCD* chez les différentes souches d'*E. coli*

SitABCD contribue à la survie d'une souche APEC dans certains sites anatomiques extra-intestinaux

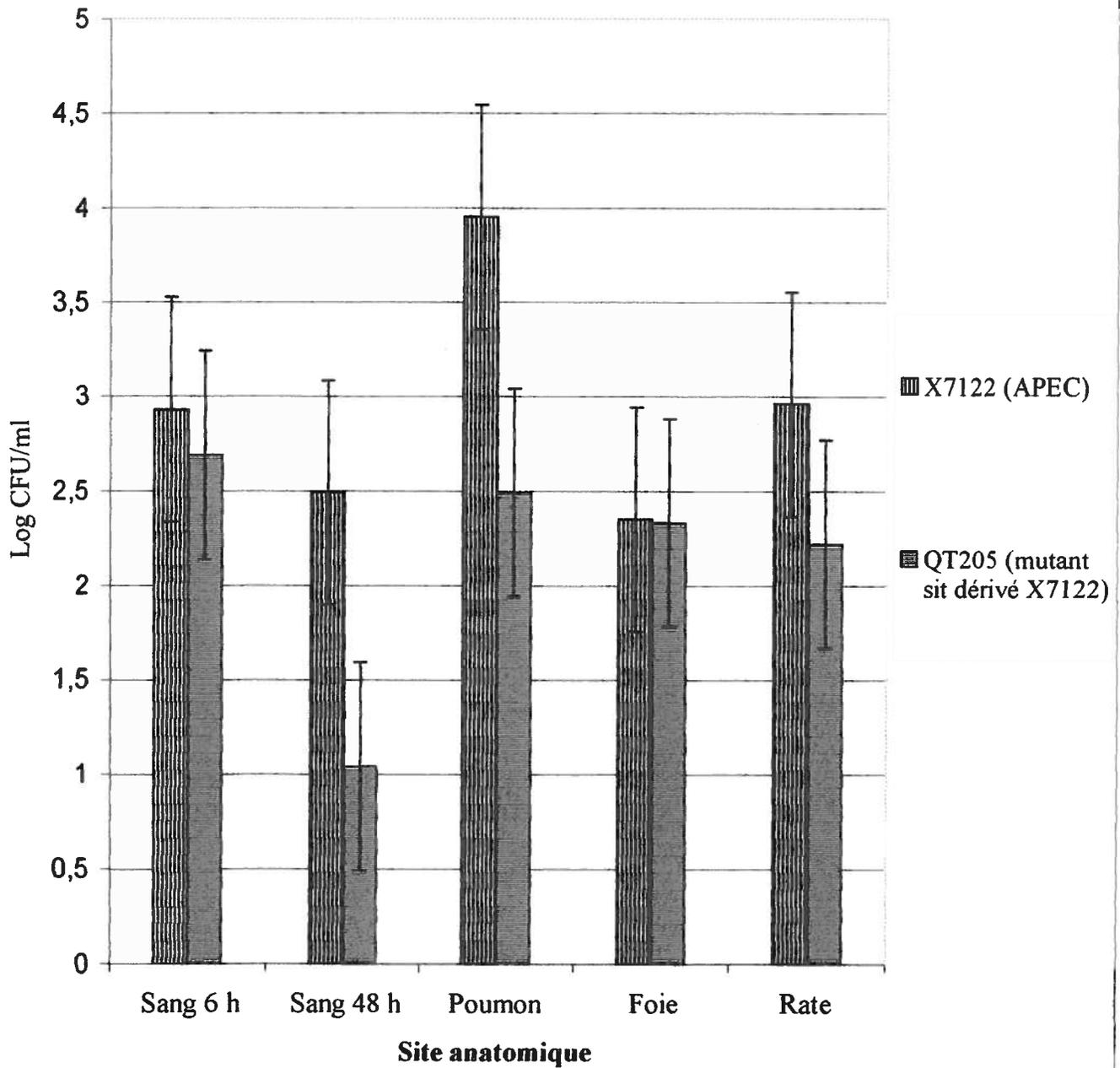


Figure 17: Contribution de SitABCD à la virulence dans certains sites anatomiques

Annexe II

Liste des abréviations et acronymes

ABC :	Cassette de liaison d'ATP (dans l'ATP-ase des transporteurs ABC)
ADP, ATP:	Adenosine di-phosphate, Adenosine tri-phosphate
ADN :	Acide désoxyribonucléique
APEC :	Souches pathogènes d' <i>E. coli</i>
ARN :	Acide ribonucléique
ARNt :	Acide ribonucléique de transfert
ATP-ase:	Enzyme hydrolysant l'ATP en ADP avec libération d'énergie
Dip :	2,6-Dipyridyl
Dps :	protéines de détoxification du fer (Famille de protéines)
EHEC :	Souches entérohémorragiques d' <i>E. coli</i>
EPEC :	Souches entériques d' <i>E. coli</i>
ETEC :	Souches entérotoxigènes d' <i>E. coli</i>
ExPEC :	Souches extra-intestinales d' <i>E. coli</i>
GDP, GTP :	Guanosine di-phosphate, guanosine tri-phosphate
Feo :	Transporteur de Fe ²⁺ dépendant de GTP
FNR :	Régulateur de réponse à l'anaérobiose.
FTN :	Ferritine
BFTN	Bactérioferritine
Fur :	Répresseur d'entrée de fer
InsA, InsB :	Séquences d'insertion d'ADN, aussi conjointement appelées <i>IS1</i>
Kat :	Catalase
MLEE :	Électrophorèse enzymatique à loci multiples.
MntR :	Répresseur de transport de manganèse
MntH :	Transporteur de manganèse dépendant du gradient de protons
OxyR :	Régulateur de la réponse au peroxyde
PCR :	Réaction d'amplification de polymérase en chaîne
Sit :	Système de transport ABC des ions métalliques divalents
Sod	Superoxyde dismutase
SoxS, SoxR :	Senseur et régulateur de la réponse au superoxyde
UPEC :	Souches pathogènes urinaires d' <i>E. coli</i>
Zur :	Répresseur d'entrée de zinc
Yfe :	Système de transport ABC des ions métalliques divalents

1. **Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones**, Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
2. **Bartsevich, V.V. and H.B. Pakrasi**, Manganese transport in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. *J Biol Chem*, 1996. **271**(42): p. 26057-61.
3. **Bearden, S.W. and R.D. Perry**, The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol*, 1999. **32**(2): p. 403-14.
4. **Bearden, S.W., T.M. Staggs, and R.D. Perry**, An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J Bacteriol*, 1998. **180**(5): p. 1135-47.
5. **Bhattacharyya-Pakrasi M, Pakrasi HB, Ogawa T, Aurora R**, Manganese transport and its regulation in bacteria. *Biochem Soc Trans*, 2002. **30**(4): p. 768-70.
6. **Bindereif, A. and J.B. Neilands**, Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid ColV. *J Bacteriol*, 1983. **153**(2): p. 1111-3.
7. **Bloch, C.A. and C.K. Rode**, Pathogenicity island evaluation in *Escherichia coli* K1 by crossing with laboratory strain K-12. *Infect Immun*, 1996. **64**(8): p. 3218-23.
8. **Boone, D.R., R.W. Castenholz, and G.M. Garrity**, *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. 2001, New York: Springer. v.
9. **Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF**, Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun*, 2002. **70**(11): p. 6032-42.
10. **Braun, V.**, Iron uptake by *Escherichia Coli*. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. S1409-21.
11. **Braun, V. and M. Braun**, Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, 2002. **529**(1): p. 78-85.
12. **Braun, V., K. Hantke, and W. Koster**, Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation. *Met Ions Biol Syst*, 1998. **35**: p. 67-145.
13. **Brown, P.K. and R. Curtiss, 3rd**, Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(20): p. 11149-54.
14. **Brown PK, Dozois CM, Nickerson CA, Zuppardo A, Terlonge J, Curtiss R 3rd.**, MlrA, a novel regulator of curli (AgF) and extracellular matrix synthesis by *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Mol Microbiol*, 2001. **41**(2): p. 349-63.
15. **Buell CR, Joardar V, Lindeberg M, Selengut J, Paulsen IT, Gwinn ML, Dodson RJ, Deboy RT, Durkin AS, Kolonay JF, Madupu R, Daugherty S, Brinkac L, Beanan MJ, Haft DH, Nelson WC, Davidsen T, Zafar N, Zhou L, Liu J, Yuan Q,**

Khouri H, Fedorova N, Tran B, Russell D, Berry K, Utterback T, Van Aken SE, Feldblyum TV, D'Ascenzo M, Deng WL, Ramos AR, Alfano JR, Cartinhour S, Chatterjee AK, Delaney TP, Lazarowitz SG, Martin GB, Schneider DJ, Tang X, Bender CL, White O, Fraser CM, Collmer A., The complete genome sequence of the *Arabidopsis* and tomato pathogen *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. 100(18): p. 10181-6.

16. **Cellier MF, Bergevin I, Boyer E, Richer E,** Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. Trends Genet, 2001. 17(7): p. 365-70.

17. **Chain P, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Lao V, Land M, Hauser L, Hooper A, Klotz M, Norton J, Sayavedra-Soto L, Arciero D, Hommes N, Whittaker M, Arp D.,** Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. J Bacteriol, 2003. 185(9): p. 2759-73.

18. **Chang, A.C. and S.N. Cohen,** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. J Bacteriol, 1978. 134(3): p. 1141-56.

19. **Clarke, T.E., L.W. Tari, and H.J. Vogel,** Structural biology of bacterial iron uptake systems. Curr Top Med Chem, 2001. 1(1): p. 7-30.

20. **Claverys, J.P.,** A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. Res Microbiol, 2001. 152(3-4): p. 231-43.

21. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen,** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol, 2000. 66(10): p. 4555-8.

22. **Compan, L and D. Touati,** Interaction of six global transcription regulators in expression of manganese superoxide dismutase in *Escherichia coli* K-12. J Bacteriol, 1993. 175(6): p. 1687-96.

23. **Coulange, F., et al.,** Isolation of genomic fragments specific for avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Amer. Soc. for Microbiol. 100th General Meeting, 2000. Abstract B-64: p. 55.

24. **Daskaleros, P.A., J.A. Stoebner, and S.M. Payne,** Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system. Infect Immun, 1991. 59(8): p. 2706-11.

25. **Datsenko, K.A. and B.L. Wanner,** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. 97(12): p. 6640-5.

26. **Dho-Moulin, M. and J.M. Fairbrother,** Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res, 1999. 30(2-3): p. 299-316.

27. **Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J.,** Analysis of genome plasticity in

pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *J Bacteriol*, 2003. **185**(6): p. 1831-40.

28. **Dobrindt, U. and J. Hacker**, Whole genome plasticity in pathogenic bacteria. *Curr Opin Microbiol*, 2001. **4**(5): p. 550-7.

29. **Dozois, C.M. and R. Curtiss, 3rd**, Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Vet Res*, 1999. **30**(2-3): p. 157-79.

30. **Dozois, C.M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd**, Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(1): p. 247-52.

31. **Dozois CM, Dho-Moulin M, Bree A, Fairbrother JM, Desautels C, Curtiss R** 3rd Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun*, 2000. **68**(7): p. 4145-54.

32. **Faraldo-Gomez, J.D. and M.S. Sansom**, Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2003. **4**(2): p. 105-16.

33. **Gong S, Bearden SW, Geoffroy VA, Fetherston JD, Perry RD**, Characterization of the *Yersinia pestis* Yfu ABC inorganic iron transport system. *Infect Immun*, 2001. **69**(5): p. 2829-37.

34. **Gonzalez-Flecha, B. and B. Demple**, Transcriptional regulation of the *Escherichia coli* oxyR gene as a function of cell growth. *J Bacteriol*, 1997. **179**(19): p. 6181-6.

35. **Griffiths, E.**, Iron in biological systems, in *Iron and infection : molecular, physiological, and clinical aspects*, J.J. Bullen and E. Griffiths, Editors. 1999, Wiley: Chichester ; New York. p. 1-26.

36. **Gyles, C.L.**, *Escherichia coli* in domestic animals and humans. 1994, Wallingford, England CAB International, 1994. xv, 666.

37. **Hacker, J. and E. Carniel**, Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *A Darwinian view of the evolution of microbes*. *EMBO Rep*, 2001. **2**(5): p. 376-81.

38. **Hacker, J., U. Hentschel, and U. Dobrindt**, Prokaryotic chromosomes and disease. *Science*, 2003. **301**(5634): p. 790-3.

39. **Hacker, J. and J.B. Kaper**, Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*, 2000. **54**: p. 641-79.

40. **Hantke, K.**, Ferrous iron uptake by a magnesium transport system is toxic for *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J Bacteriol*, 1997. **179**(19): p. 6201-4.

41. **Hantke, K.**, Bacterial zinc transporters and regulators. *Biometals*, 2001. **14**(3-4): p. 239-49.

55. **Johnson, J.R. and T.A. Russo**, Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". *J Lab Clin Med*, 2002. **139**(3): p. 155-62.
56. **Joset, F., J. Guespin-Michel, and L.O. Butler**, Prokaryotic genetics : genome organization, transfer and plasticity. *Studies in microbiology*. 1993, Oxford ; Boston: Blackwell Scientific Publications. ix, 454.
57. **Kado, C.I. and S.T. Liu**, Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol*, 1981. **145**(3): p. 1365-73.
58. **Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke**, Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1993. **175**(19): p. 6212-9.
59. **Kang HY, Dozois CM, Tinge SA, Lee TH, Curtiss R 3rd**. Transduction-mediated transfer of unmarked deletion and point mutations through use of counterselectable suicide vectors. *J Bacteriol*, 2002. **184**(1): p. 307-12.
60. **Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME.**, Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. *J Bacteriol*, 2002. **184**(12): p. 3151-8.
61. **Kehres DG, Janakiraman A, Slauch JM, Maguire ME.**, SitABCD is the alkaline Mn²⁺ transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol*, 2002. **184**(12): p. 3159-66.
62. **Kehres, D.G. and M.E. Maguire**, Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 2003. **27**(2-3): p. 263-90.
63. **Kehres DG, Zaharik ML, Finlay BB, Maguire ME**, The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol Microbiol*, 2000. **36**(5): p. 1085-100.
64. **Klebba, P.E.**, Three paradoxes of ferric enterobactin uptake. *Front Biosci*, 2003. **8**: p. 1422-36.
65. **La Ragione, R.M. and M.J. Woodward**, Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci*, 2002. **73**(1): p. 27-35.
66. **Lee, H.J. and M.B. Gu**, Construction of a *sodA::luxCDABE* fusion *Escherichia coli*: comparison with a *katG* fusion strain through their responses to oxidative stresses. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003. **60**(5): p. 577-80.
67. **Lewin, B.**, Gènes VI. 1999, Paris ; Bruxelles: De Boeck Université. xvii, 1268.
68. **Liochev SI, Benov L, Touati D, Fridovich I**, Induction of the *soxRS* regulon of *Escherichia coli* by superoxide. *J Biol Chem*, 1999. **274**(14): p. 9479-81.
69. **Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF.**, et al., Identification of the *Escherichia coli* K-12 *Nramp* orthologue (*MntH*) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol*, 2000. **35**(5): p. 1065-78.

70. **McHugh JP, Rodriguez-Quinones F, Abdul-Tehrani H, Svistunenko DA, Poole RK, Cooper CE, Andrews SC.** Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem*, 2003. **278**(32): p. 29478-86.
71. **Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R 3rd, Brown PK, Arne P, Bree A, Desautels C, Fairbrother JM.** Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun*, 2003. **71**(1): p. 536-40.
72. **Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss R 3rd, Lehoux B, Fairbrother JM.** Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun*, 2003. **71**(1): p. 494-503.
73. **Miller, R.A. and B.E. Britigan.** Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clin Microbiol Rev*, 1997. **10**(1): p. 1-18.
74. **Mobley HL, Green DM, Trifillis AL, Johnson DE, Chippendale GR, Lockett CV, Jones BD, Warren JW.** Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun*, 1990. **58**(5): p. 1281-9.
75. **Nag, D.K., H.V. Huang, and D.E. Berg.** Bidirectional chain-termination nucleotide sequencing: transposon Tn5seq1 as a mobile source of primer sites. *Gene*, 1988. **64**(1): p. 135-45.
76. **Nataro, J.P. and J.B. Kaper.** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 1998. **11**(1): p. 142-201.
77. **Neidhardt, F.C. and R. Curtiss.** *Escherichia coli* and *Salmonella* : cellular and molecular biology. 2nd ed. 1996, Washington, D.C.: ASM Press. 2 v. (xx, 2822).
78. **Niederhoffer EC, Naranjo CM, Bradley KL, Fee JA.** Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (sodA and sodB) genes by the ferric uptake regulation (fur) locus. *J Bacteriol*, 1990. **172**(4): p. 1930-8.
79. **Nunoshiba T, Obata F, Boss AC, Oikawa S, Mori T, Kawanishi S, Yamamoto K.** Role of iron and superoxide for generation of hydroxyl radical, oxidative DNA lesions, and mutagenesis in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(49): p. 34832-7.
80. **Nunoshiba T, Watanabe T, Nakabeppu Y, Yamamoto K.** Mutagenic target for hydroxyl radicals generated in *Escherichia coli* mutant deficient in Mn- and Fe-superoxide dismutases and Fur, a repressor for iron-uptake systems. *DNA Repair (Amst)*, 2002. **1**(5): p. 411-418.
81. **Ochman, H. and R.K. Selander.** Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol*, 1984. **157**(2): p. 690-3.

82. **Oelschlaeger, T.A., U. Dobrindt, and J. Hacker**, Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *Int J Antimicrob Agents*, 2002. 19(6): p. 517-21.
83. **Ohnishi, M., K. Kurokawa, and T. Hayashi**, Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol*, 2001. 9(10): p. 481-5
84. **Patzer, S.I. and K. Hantke**, The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 1998. 28(6): p. 1199-210.
85. **Patzer, S.I. and K. Hantke**, The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 2000. 275(32): p. 24321-32.
86. **Patzer, S.I. and K. Hantke**, Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the mntH gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001. 183(16): p. 4806-13.
87. **Payne, S.M.**, Iron and virulence in *Shigella*. *Mol Microbiol*, 1989. 3(9): p. 1301-6.
88. **Pelmont, J.**, Bactéries et environnement : adaptations physiologiques. Collection Grenoble sciences. 1993, Grenoble: Presses Universitaires de Grenoble. 899.
89. **Perry RD, Shah J, Bearden SW, Thompson JM, Fetherston JD**. *Yersinia pestis* TonB: role in iron, heme, and hemoprotein utilization. *Infect Immun*, 2003. 71(7): p. 4159-62.
90. **Picard, B., et al.**, The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun*, 1999. 67(2): p. 546-53.
91. **Picard B, Garcia JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E**, Touch and go: tying TonB to transport. *Mol Microbiol*, 2003. 49(4): p. 869-82.
92. **Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein**, *Microbiologie*. 1995, Bruxelles: De Boeck-Wesmael. xxxii, 1014.
93. **Provence, D.L. and R. Curtiss, 3rd**, 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*, 1992. 60(11): p. 4460-7.
94. **Rajakumar, K., C. Sasakawa, and B. Adler**, Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri* she pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. *Infect Immun*, 1997. 65(11): p. 4606-14.
95. **Reeves, S.A., A.G. Torres, and S.M. Payne**, TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun*, 2000. 68(11): p. 6329-36.

96. **Rich C, Alfidja A, Sirot J, Joly B, Forestier C.** Identification of human enterovirulent *Escherichia coli* strains by multiplex PCR. *J Clin Lab Anal*, 2001. **15**(2): p. 100-3.
97. **Runyen-Janecky LJ, Reeves SA, Gonzales EG, Payne SM.** Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun*, 2003. **71**(4): p. 1919-28.
98. **Russo, T.A. and J.R. Johnson**, Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*, 2000. **181**(5): p. 1753-4.
99. **Sambrook, J. and D.W. Russell**, *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3rd Ed. ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
100. **Schwyn, B. and J.B. Neilands**, Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem*, 1987. **160**(1): p. 47-56.
101. **Seaver, L.C. and J.A. Imlay**, Hydrogen peroxide fluxes and compartmentalization inside growing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(24): p. 7182-9.
102. **Silver, S.**, Active transport of magnesium in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1969. **62**(3): p. 764-71.
103. **Silver, S. and M.L. Kralovic**, Manganese accumulation by *Escherichia coli*: evidence for a specific transport system. *Biochem Biophys Res Commun*, 1969. **34**(5): p. 640-5.
104. **Sorsa LJ, Dufke S, Heesemann J, Schubert S.** 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*, 2003. **71**(6): p. 3285-93.
105. **Stojiljkovic, I., M. Cobeljic, and K. Hantke**, *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiol Lett*, 1993. **108**(1): p. 111-5.
106. **Sussman, M.**, *Escherichia coli* : mechanisms of virulence. 1997, Cambridge ; New York: Cambridge University Press. xvi, 639 , [1] of plates.
107. **Tardat, B. and D. Touati**, Iron and oxygen regulation of *Escherichia coli* MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcA for binding to DNA. *Mol Microbiol*, 1993. **9**(1): p. 53-63.
108. **Touati D, Jacques M, Tardat B, Bouchard L, Despied S.** Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol*, 1995. **177**(9): p. 2305-14.
109. **Vidal SM, Pinner E, Lepage P, Gauthier S, Gros P** Natural resistance to intracellular infections: Nramp1 encodes a membrane phosphoglycoprotein absent in

- macrophages from susceptible (Nramp1 D169) mouse strains. *J Immunol*, 1996. **157**(8): p. 3559-68.
110. **Vokes SA, Reeves SA, Torres AG, Payne SM** The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Mol Microbiol*, 1999. **33**(1): p. 63-73.
111. **Wang, R.F. and S.R. Kushner**, Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene*, 1991. **100**: p. 195-9.
112. **Waters, V.L. and J.H. Crosa**, Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev*, 1991. **55**(3): p. 437-50.
113. **Wei J, Goldberg MB, Burland V, Venkatesan MM, Deng W, Fournier G, Mayhew GF, Plunkett G 3rd, Rose DJ, Darling A, Mau B, Perna NT, Payne SM, Runyen-Janecky LJ, Zhou S, Schwartz DC, Blattner FR.**, Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun*, 2003. **71**(5): p. 2775-86.
114. **Welch RA, Burland V, Plunkett G 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Sonnenberg MS, Blattner FR.**, Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(26): p. 17020-4.
115. **Whittaker, J.W.**, Prokaryotic manganese superoxide dismutases. *Methods Enzymol*, 2002. **349**: p. 80-90.
116. **Zheng M, Doan B, Schneider TD, Storz G**, OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol*, 1999. **181**(15): p. 4639-43.
117. **Zhou, D., W.D. Hardt, and J.E. Galan**, *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun*, 1999. **67**(4): p. 1974-81.
118. **Ziebuhr W, Ohlsen K, Karch H, Korhonen T, Hacker J.**, Evolution of bacterial pathogenesis. *Cell Mol Life Sci*, 1999. **56**(9-10): p. 719-28.
119. **Crosa, J.H. and C.T. Walsh**, Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002. **66**(2): p. 223-49.
120. **Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, Aller SG, Unger VM**, The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 16243-8.
121. **Tsolis RM, Baumler AJ, Heffron F, Stojiljkovic L.**, Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect Immun*, 1996. **64**(11): p. 4549-56.

122. **Woodmansee, A.N. and J.A. Imlay**, Quantitation of intracellular free iron by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Methods Enzymol*, 2002. **349**: p. 3-9.
123. **Masse, E. and S. Gottesman**, A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(7): p. 4620-5.
124. **Baichoo, N. and J.D. Helmann**, Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol*, 2002. **184**(21): p. 5826-32.
125. **Linton, K.J. and C.F. Higgins**, The *Escherichia coli* ATP-binding cassette (ABC) proteins. *Mol Microbiol*, 1998. **28**(1): p. 5-13.
126. **Runyen-Janecky, L.J. and S.M. Payne**, Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. *Infect Immun*, 2002. **70**(8): p. 4379-88.
127. **Tseng HJ, Srikhanta Y, McEwan AG, Jennings MP et al.**, Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Mol Microbiol*, 2001. **40**(5): p. 1175-86.
128. **Rabinowitch, H.D., C.T. Privalle, and I. Fridovich**, Effects of paraquat on the green alga *Dunaliella salina*: protection by the mimic of superoxide dismutase, Desferal-Mn(IV). *Free Radic Biol Med*, 1987. **3**(2): p. 125-31.
129. **Stadtman, E.R., B.S. Berlett, and P.B. Chock**, Manganese-dependent disproportionation of hydrogen peroxide in bicarbonate buffer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1990. **87**(1): p. 384-8.
130. **Sharpe MA, Olsson R, Stewart VC, Clark JB.**, Oxidation of nitric oxide by oxomanganese-salen complexes: a new mechanism for cellular protection by superoxide dismutase/catalase mimetics. *Biochem J*, 2002. **366**(Pt 1): p. 97-107.
131. **McDonald MC, d'Emmanuele di Villa Bianca R, Wayman NS, Pinto A, Sharpe MA, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Thiemermann C.**, A superoxide dismutase mimetic with catalase activity (EUK-8) reduces the organ injury in endotoxic shock. *Eur J Pharmacol*, 2003. **466**(1-2): p. 181-9.
132. **Tao, K.**, oxyR-dependent induction of *Escherichia coli* grx gene expression by peroxide stress. *J Bacteriol*, 1997. **179**(18): p. 5967-70.
133. **Gaudu, P. and B. Weiss**, Flavodoxin mutants of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 2000. **182**(7): p. 1788-93.
134. **Campoy S, Jara M, Busquets N, Perez De Rozas AM, Badiola I, Barbe J..**, Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence. *Infect Immun*, 2002. **70**(8): p. 4721-5.
135. **Waters, V.L. and J.H. Crosa**, Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev*, 1991. **55**(3): p. 437-50.

136. **Zerbib D, Polard P, Escoubas JM, Galas D, Chandler M**, The regulatory role of the IS1-encoded InsA protein in transposition. *Mol Microbiol*, 1990. **4**(3): p. 471-7.
137. **Jenkinson, H.F.**, Cell surface protein receptors in oral streptococci. *FEMS Microbiol Lett*, 1994. **121**(2): p. 133-40.
138. **Robbe-Saule V, Coynault C, Ibanez-Ruiz M, Hermant D, Norel F.** Identification of a non-haem catalase in *Salmonella* and its regulation by RpoS (sigmaS). *Mol Microbiol*, 2001. **39**(6): p. 1533-45.
139. **Runyen-Janecky, L.J., M. Hong, and S.M. Payne**, The virulence plasmid-encoded impCAB operon enhances survival and induced mutagenesis in *Shigella flexneri* after exposure to UV radiation. *Infect Immun*, 1999. **67**(3): p. 1415-23.
140. **Rudi, K., O.M. Skulberg, and K.S. Jakobsen**, Evolution of cyanobacteria by exchange of genetic material among phylogenetically related strains. *J Bacteriol*, 1998. **180**(13): p. 3453-61.
142. **Muhairwa, A.P., J.P. Christensen, and M. Bisgaard**, Relationships among Pasteurellaceae isolated from free ranging chickens and their animal contacts as determined by quantitative phenotyping, ribotyping and REA-typing. *Vet Microbiol*, 2001. **78**(2): p. 119-37.
143. **Niven, D.F. and A. Ekins**, Iron content of *Streptococcus suis* and evidence for a dpr homologue. *Can J Microbiol*, 2001. **47**(5): p. 412-6.
142. **Niven, D.F., A. Ekins, and A.A. al-Samaurai**, Effects of iron and manganese availability on growth and production of superoxide dismutase by *Streptococcus suis*. *Can J Microbiol*, 1999. **45**(12): p. 1027-32.