INRS - Institut Armand-Frappier

Analyse transcriptionelle des gènes conservés chez la souche uropathogène *Escherichia coli* CFT073 dans le tractus urinaire de la souris.

par

Barbara Augustin

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

Jury d'évaluation

Président du jury

et examinateur interne

François Shareck, INRS/Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

Josée Harel

Faculté de médecine vétérinaire

Département de pathologie et de microbiologie

Université de Montréal (St-Hyacinthe)

Directeur de recherche

Charles M. Dozois, INRS/Institut Armand-Frappier

Codirectrice de recherche

France Daigle,

Faculté de médecine

Département de microbiologie et d'immunologie

Université de Montréal

State of the state of the state of

all the state of the second of

Résumé

Les infections du tractus urinaire (ITU) font parties des infections bactériennes les plus fréquentes. Elles sont causées par certaines souches du genre *Escherichia coli* (souches uropathogènes ou extra-intestinales) qui constituent plus de 80% des complications (cystites, pyélonéphrites) qui surviennent suite à ces infections. Le présent projet de recherche a permis d'analyser l'expression différentielle (in vivo versus in vitro) des gènes conservés lors d'ITU en utilisant des biopuces d'ADN d'*E. coli* K-12 (souche MG1655).

La souche uropathogène *E. coli* CFT073, provenant d'un cas de pyélonéphrite aiguë, a été utilisée pour l'infection de souris femelles grâce au modèle ascendant d'ITU. Cette même souche a servi à la préparation d'une culture in vitro. Une technique émergente, nommée SCOTS (capture sélective des séquences transcrites), a été utilisée afin de capturer les transcrits procaryotes. Les produits SCOTS obtenus ont été utilisés comme sondes afin d'hybrider des lames d'*E. coli* K-12 MG1655 (*Gene Expression Center / University of Wisconsin*). Des analyses génomiques ont démontré que 74% des cadres de lecture ouverts (3189 en tout) d'*E. coli* K-12 étaient présents chez la souche *E. coli* CFT073. Les données obtenues lors de l'expérience des biopuces ont finalement été confirmées par PCR quantitatif en temps réel (qRT-PCR).

L'analyse statistique des résultats obtenus suite à l'hybridation des biopuces a permis de détecter 466 gènes (15% de l'ensemble des gènes présents sur la lame) présentant une expression différentielle (149 gènes induits et 317 gènes réprimés) significative. Cette étude a démontré qu'il n'y avait pas vraiment de différences entre l'expression des gènes conservés dans la vessie et dans les reins par rapport à l'expression de ces mêmes gènes dans une culture in vitro. Parmis les classes fonctionnelles des gènes les plus représentées, on retrouve celles du métabolisme des acides gras, du métabolisme des nucléotides, de la biosynthèse des cofacteurs et de la réplication de l'ADN. Près de la

moitié des données significatives obtenues constituent des gènes aux fonctions putatives ou totalement inconnues.

Les résultats de biopuces obtenus ont démontré que l'utilisation d'une technique telle que SCOTS apportait un avantage significatif lors de l'étude de l'expression différentielle des gènes pendant une infection. De plus, ce projet de recherche a permis de cibler des gènes conservés différentiellement exprimés lors de l'infection du tractus urinaire de la souris.

Barbara Augustin

Étudiante

Charles M. Dozois

Directeur de recherche

À Kam

Remerciements

Mes premiers remerciements vont, de surcroît, à mon directeur de recherche, Charles Dozois, puisque c'est grâce à lui que j'ai pu entamer des études post-graduées. Il m'a permis de travailler sur un sujet très intéressant, mais surtout avec des techniques encore peu connues et en émergence (SCOTS et les biopuces à ADN) qui ont fait de moi une personne avec une expertise toute particulière.

Un grand merci à ma codirectrice France Daigle puisque c'est grâce à elle que j'ai pu faire mon premier stage dans son laboratoire pendant mon baccalauréat. C'est cette expérience qui m'a donné le goût de faire de la recherche et d'entamer des études post-graduées. Je tiens à remercier également Sébastien Faucher, étudiant au doctorat dans le laboratoire de France Daigle, pour sa très grande patience à l'égard de mes questions incessantes. Sans lui, mes analyses de données de biopuces auraient été encore plus laborieuses.

Un immense merci au Dr James R Johnson pour m'avoir accueillie dans son laboratoire au Minnesota (*Veterans Affairs Medical Center*). Merci aussi à sa technicienne Connie Clabots puisque sans elle, je n'aurais pas été en mesure de bien maîtriser la technique du modèle d'infection ascendante du tractus urinaire. Un remerciement tout spécial à Tracy Rigby et Miria Élias de l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) pour leurs précieux conseils lors de mes visites à leur institution lors de la scanographie de mes lames de biopuces à ADN.

Je remercie tous les membres du laboratoire Dozois pour leur support et leurs conseils à un moment ou un autre au cours de ma maîtrise. Je tiens aussi à remercier la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier qui m'a été accordé au cours de ces années de maîtrise. Je remercie également les correcteurs de mon mémoire pour leurs conseils judicieux.

Finalement, je veux remercier tout spécialement ma famille, ma meilleure amie Debby et sa mère, mon copain et sa famille pour leur soutien constant et leur amour sans bornes. Leurs encouragements m'ont permis de ne pas me laisser abattre lorsque certaines étapes de mon cheminement devenaient plus difficiles.

Liste des figures

Figure 1.1 Diversité génomique de trois souches de E. coli	0
Figure 1.2 Appareils génito-urinaires de la femme et de l'homme	7
Figure 1.3 Représentation schématique de la technique IVET5	0
Figure 1.4 Représentation schématique de la technique STM	3
Figure 1.5 Représentation schématique de la technique DFI	6
Figure 1.6 Représentation schématique de la technique de SCOTS5	8
Figure 1.7 Les deux principaux types de biopuces.	3
Figure 1.8 Effets des différentes rondes de SCOTS sur la population d'ADNc6	8
Figure 1.9 Méthode de détection quantitative des amplicons: agents se liant à l'ADNdb7	2
Figure 1.10 Méthode de détection quantitative des amplicons : hydrolyse de sondes	13
Figure 1.11 Méthode de détection quantitative des amplicons: hybridation de deux	
sondes7	4
Figure 1.12 Méthode de détection quantitative des amplicons: balises moléculaires7	15
Figure 1.13 Méthode de détection quantitative des amplicons: amorces scorpion7	15
Figure 3.1 Hybridation Southern de l'ADNg d'E. coli CFT073 avec des sondes	
correspondant à l'ADNc des différentes rondes de SCOTS provenant des vessies 10)4
Figure 3.2 Diagramme de Venn illustrant le nombre de gènes induits ou réprimés dans	
les différents tissus.)5
Figure 3.4 Coefficient de corrélation entre les données des différentes conditions)7
Figure 3.5 Les classes fonctionnelles les plus représentées au niveau de la vessie et des	
reins lors de l'infection du tractus urinaire de la souris.)8
Figure 3.6 Comparaison des résultats du qRT-PCR par rapport aux résultats des	
biopuces11	l 1
Figure B.1 Système à deux composantes de régulation de l'azote	16
Figure B.2 Voie de biosynthèse de la lysine	1 7
Figure B.3 Élongation des chaînes d'acides gras insaturés	18
Figure B.4 Voie de dégradation du D-galacturonate	1 9
Figure B.5 Voie de dégradation des hexuronates	50
Figure B.6 Voie de biosynthèse de la biotine	51

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Exemples d'applications des biopuces
Tableau 2.1	Liste des amorces utilisées pour la synthèse d'ADNc et la vérification des
rondes d	e SCOTS89
Tableau 2.2	Gènes étudiés et amorces associées qui ont été utilisées lors de l'expérience
de qRT-	PCR
Tableau 3.1	Comptage bactérien de l'inoculum de départ
Tableau 3.2	Détermination du nombre de bactéries inoculées à partir des données sur
l'injection	on de l'inoculum de départ102
Tableau 3.3	Comptes bactériens suite à l'infection du tractus urinaire de 10 souris par la
bactérie	E. coli CFT073
Tableau 3.4	Exemples de gènes induits in vivo lors de l'infection du tractus urinaire
chez la s	ouris
Tableau 3.5	Exemples de gènes réprimés in vivo lors de l'infection du tractus urinaire
chez la s	ouris
Tableau A.1	Gènes induits in vivo lors de l'infection du tractus urinaire chez la souris 135
Tableau A.2	Gènes réprimés in vivo lors de l'infection du tractus urinaire

Liste des abréviations

μg: microgramme

μl: microlitre

μm: micromètre

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNdb: acide désoxyribonucléique double brin

ADNg: acide désoxyribonucléique génomique

ADNr: acide désoxyribonucléique ribosomal

ANOVA: analysis of variance / analyse de la variance

APEC : avian pathogenic Escherichi coli | Escherichia coli pathogènes aviaires

ARN: acide ribonucléique

ARNm: acide ribonucléique messager

ARNr: acide ribonucléique ribosomal

ARNt : acide ribonucléique de transfert

CBI: communautés bactériennes intracellulaires

cm: centimètre

CNF 1: cytotoxic necrotizing factor 1 / facteur nécrotique cytotoxique 1

D.O.: densité optique

DAEC : diffusely adherent <u>Escherichia coli</u> / Escherichia coli d'adhérence diffuse

DAF: decay accelerating factor / facteur accélérateur de dissociation

DFI: differential induction fluorescence / induction différentielle de la fluorescence

DIG: digoxigénine

E. coli: Escherichia coli

EAEC: enteroaggregative Escherichia coli | Escherichia coli entéroaggrégatives

ECOR: Escherichia coli Reference Collection / collection de référence d'Escherichia

coli

EHEC: enterohemorrhagic Escherichia coli | Escherichia coli entérohémorragiques

EIEC: enteroinvasine Escherichia coli / Escherichia coli entéroinvasives

EPEC : enteropathogenic Escherichia coli / Escherichia coli entéropathogènes

EtBr: bromure d'éthidium

ETEC : enterotoxigenic Escherichia coli / Escherichia coli entérotoxigéniques

ExPEC: Escherichia coli pathogènes extra-intestinaux

FACS: fluorescence-activated cell sorting

FRET : fluorescence resonance energy transfer / transfert d'énergie de fluorescence par

résonance

G: gauge

gfp: green fluorescent protein / protéine fluorescente verte

GTPase: guanosine triphosphatase

Ig: immunoglobulines

IL: interleukines

IPEC: intestinal pathogenic Escherichia coli / Escherichia coli pathogènes intestinaux

ITU: infection du tractus urinaire

IVET: in vivo expression technology

ivi: gènes induits in vivo

LB: milieu Luria-Bertani

LPS: lipopolysaccharides

M: molaire

MAC: membrane attack complex / complexe d'attaque membranaire

Mb: mégabases

ml: millilitres

MLEE: multilocus enzyme electrophoresis

MLST: multilocus sequence typing

mM: millimolaire

 $ORF: \textit{open reading frame} \ / \ cadre \ de \ lecture \ ouvert$

PAIs: pathogenicity islands / îlots de pathogénicité

pb: paires de bases

PBS: phosphate buffered saline / tampon phosphate salin

PCR: polymerase chain reaction / réaction de polymérase en chaîne

PMNs : polymorphonucléaires

qRT-PCR : réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps réel

rDNase: désoxyribonucléase recombinante

RNase: ribonucléase

RT: transcription inverse

RT-PCR: réaction de polymérase en chaîne par transcription inverse

SCOTS: selective capture of transcribed sequences / capture sélective des séquences

transcrites

SDS: dodécylsulfate de sodium

sec: secondes

SPATES: serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae / autotransporteurs

sérine protéase des Enterobacteriaceae

STM: signature-tagged mutagenesis

TE: tampon Tris-EDTA

THP: Tamm-Horsfall protein / protéine Tamm-Horsfall

TLR: toll-like receptors / récepteurs « toll-like »

TMP-SMX: triméthoprime-sulfaméthoxazole

UFC: unité formatrice de colonies

UPEC: E. coli uropathogènes ou pathogènes du tractus urinaire

x g : relative centrifugation force (RCF) $(1,12r (RPM/1000))^2$ où r = rayon en millimètre et RPM = révolution par minute

Table des matières

Résumé	III
Remerciements	VI
Liste des figures	VIII
Liste des tableaux	IX
Liste des abréviations	
Table des matières	
Introduction	4
Chapitre 1. Revue de littérature	7
1.1 Escherichia coli	9
1.1.1 Les caractéristiques générales	9
1.1.2 Les E. coli pathogènes	
1.1.3 La classification sérologique	12
1.1.4 La distribution phylogénétique et la collection ECOR	13
1.2 Les caractéristiques des souches UPEC	16
1.2.1 Les infections causées par les UPEC	16
1.2.2 Les facteurs de virulence des UPEC	
1.2.2.1 Les facteurs d'adhésion	
1.2.2.2 Les toxines	
1.2.2.3 Les systèmes de capture du fer	
1.2.2.4 Les polysaccharides de la capsule	34
1.2.2.5 La résistance au sérum	
1.2.2.6 Le sérotype	
1.2.2.7 La formation de biofilms	
1.2.2.8 Les gènes conservés	38
1.2.3 Les facteurs de résistance de l'hôte	
1.2.4 Les modèles d'infection	44
1.2.4.1 Les modèles in vitro et cellulaires	
1.2.4.2 Les modèles in vivo	
1.3 Analyse de l'expression génique	48
1.3.1 IVET	
1.3.1.1 Description sommaire de la technique	
1.3.1.2 Avantages et inconvénients	
1.3.2 STM	52
1.3.2.1 Description sommaire de la technique	
1.3.2.2 Avantages et inconvénients	
1.3.3 DFI	55

1.3.3.1 Description sommaire de la technique	55
1.3.3.2 Avantages et inconvénients	
1.3.4 SCOTS	
1.3.4.1 Description sommaire de la technique	58
1.3.4.2 Avantages et inconvénients	61
1.3.5 Biopuces à ADN	61
1.3.5.1 Description sommaire de la technique	62
1.3.5.2 Avantages et inconvénients	68
1.3.6 qRT-PCR	70
1.3.6.1 Description sommaire de la technique	71
1.3.6.2 Avantages et inconvénients	76
Chapitre 2. Matériel et méthodes	79
2.1 Souches bactériennes et conditions de culture	81
2.1.1 Préparation de la culture in vitro	
2.1.2 Préparation de l'inoculum (pour l'infection des souris)	82
2.2 Infection du tractus urinaire des souris	82
2.2.1 Anesthésie des souris	
2.2.2 Préparation du système injectant l'inoculum	83
2.2.3 Cathétérisation	84
2.2.4 Injection de l'inoculum	84
2.2.5 Vérification de la stérilité de la souris avant l'infection	
2.2.6 Prélèvement des organes et de l'urine	85
2.2.7 Comptage bactérien	86
2.3 Extraction/purification de l'ARN et synthèse de l'ADNc	86
2.3.1 Extraction de l'ARN	86
2.3.2 Purification de l'ARN	
2.3.3 Synthèse de l'ADNc	
2.3.4 Purification de l'ADNc et vérification sur gel d'agarose	
2.4 SCOTS	89
2.4.1 Photobiotinylation	90
2.4.2 Normalisation	
2.4.3 Capture (SCOTS)	91
2.4.4 Vérification de la ronde de SCOTS	92
2.4.4.1 Hybridation Southern	93
2.5 Biopuces à ADN	94
2.5.1 Marquage des sondes SCOTS et de la sonde génomique	94
2.5.2 Préhybridation et hybridation des lames	95
2.5.3 Lavage des lames	96
2.5.4 Scanographie des lames et analyses statistiques	96
2.6 qRT-PCR	97
2.6.1 Préparation des échantillons	97
2.6.2 Analyse des résultats	98
Chapitre 3. Résultats	99
2.1 Infaction du tractus urinaire des souris	101

3.2 SCOTS	104
3.3 Biopuces à ADN	
3.4 qRT-PCR	111
Chapitre 4. Discussion	113
4.1 Infection du tractus urinaire des souris	115
4.2 SCOTS	115
4.3 Biopuces à ADN et confirmation par qRT-PCR	116
Conclusion	133
Annexe A	135
Annexe B	146
Références	152
Sites internet	175

Introduction

Afin de bien comprendre les différents mécanismes par lesquels les pathogènes déjouent le système immunitaire, se répliquent et causent des maladies, il devient nécessaire d'identifier les produits des gènes qui sont requis lors de ces processus. Les facteurs de virulence, en général, ne sont pas exprimés de façon constitutive. Leur identification est donc limitée et dépend de l'habileté à mimer les signaux environnementaux de l'hôte in vitro et in vivo (Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a). Plusieurs techniques ont été utilisées, jusqu'à présent, afin de permettre l'étude de l'expression génique des pathogènes: in vivo expression technology (IVET), signature-tagged mutagenesis (STM) et l'induction différentielle de la fluorescence (DFI/differential fluorescence induction). Ces techniques ont souvent été utilisées afin d'étudier l'expression des gènes bactériens lors de l'infection. Toutefois, le travail avec de l'ARNm bactérien vient poser trois principaux problèmes: (1) la demi-vie de l'ARNm bactérien est de moins de 2 minutes, donc il doit être rapidement stabilisé pendant son extraction, (2), l'ARNm bactérien se retrouve souvent en quantité limitée dans les organes lors de l'infection et (3), l'expression des gènes peut rapidement changer en réponse aux stimuli environnementaux résultant en des artéfacts lors de la préparation de l'ARN et de l'analyse des résultats (Shelburne et Musser, 2004). Plus récemment, une nouvelle technique a permis de régler plusieurs de ces problèmes. La technique de capture sélective des séquences transcrites (SCOTS) a été développée et publiée pour la première fois en 1999 par Graham (Graham et Clark-Curtiss, 1999). Lors d'une étude sur les E. coli pathogènes aviaires (APEC), l'utilisation de la technique de (SCOTS) a permis de cibler plusieurs gènes codant pour des facteurs de virulence, mais aussi des gènes appartenant aux séquences conservées chez l'ensemble des E. coli (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). Ce dernier point a mis en lumière l'hypothèse à la base du présent projet de recherche, quant à savoir que les gènes conservés devaient, eux aussi, contribuer à la virulence des souches pathogènes lors de l'infection. Cette hypothèse a donc été utilisée pour l'étude des infections du tractus urinaire (ITU) causées par les souches d'Escherichia coli.

La majorité des ITU sont causées par des pathogènes extra-intestinaux du genre Escherichia coli (UPEC / E. coli pathogènes du tractus urinaire) qui affectent plusieurs centaines de millions de personnes chaque année. Ces mêmes pathogènes sont la cause de 80 à 90% des cas d'ITU ambulatoires¹, de 73% des cas d'ITU chez les individus de plus de 50 ans et de 25% des cas d'ITU nocosomiales (Russo et al., 1999). Plusieurs manifestations cliniques peuvent découler de ce type d'infection telles que les urétrites et les cystites. Les complications associées aux ITU sont des pyélonéphrites aiguës, des abcès au niveau des reins, des bactériémies avec ou sans choc septique, de la morbidité et de la mortalité (Russo et al., 1999). Ce sont les femmes, les enfants et les personnes âgées qui sont le plus susceptibles aux ITU soit à cause de leur anatomie (femmes) soit à cause du caractère immunodéprimé de leur système de défense (enfants et personnes âgées) (Warren, 1996). Chez les jeunes femmes, il y a de grande possibilité de récurrence, on évalue donc que le taux d'épisodes de cystites aiguës est de 0.5 à 0.7 épisodes par femme par année; ce qui représente des coûts élevés au niveau des soins de santé (Finer et Landau, 2004). Malgré des traitements à l'aide d'antimicrobiens comme la triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX), l'augmentation de la résistance aux antibiotiques des UPEC rend difficile la lutte contre ces pathogènes (Gupta, Scholes et Stamm, 1999).

Étant donné le grand nombre d'études qui ont porté sur les facteurs de virulence, le présent projet de recherche a plutôt porté sur l'expression des gènes conservés lors de l'infection. L'expression différentielle des gènes conservés (in vivo versus in vitro) d'une souche UPEC a donc été évaluée lorsqu'elle se retrouve dans la vessie et les reins suite à l'infection ascendante du tractus urinaire de souris femelles de quelques semaines (Hagberg et al., 1983). La souche utilisée dans le cadre du présent projet de recherche a été séquencée par l'équipe de Mobley (Welch et al., 2002). E. coli CFT073 est une souche uropathogène qui a été isolée d'une patiente atteinte du syndrome clinique de pyélonéphrite aiguë à l'hôpital de l'Université du Maryland (Mobley et al., 1990). Son génome est de 5,23 mégabases (Mb) comparé à la souche de laboratoire E. coli K-12 MG1655 dont le génome n'est que de 4,64 Mb (Welch et al., 2002). L'acquisition de

¹ Malade ambulatoire: patient qui n'est pas hospitalisé (site internet #5).

plusieurs facteurs de virulence (fimbriae P, fimbriae type 1, hémolysine, aérobactine, capsule, etc.) localisé sur des îlots de pathogénicité (PAIs) est à la base de ce surplus de contenu génétique. Ces derniers ont permis à cette souche de causer des infections au niveau du tractus urinaire et au niveau de la circulation sanguine, en plus de lui donner la capacité d'évader au système de défense de l'hôte. De façon surprenante, aucun plasmide n'a été retrouvé chez cette souche (Welch et al., 2002). Pour mener à bien ce projet de recherche, trois techniques principales ont été utilisées: SCOTS, les biopuces à acides désoxyribonucléiques (ADN) et la réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps réel (qRT-PCR).

Avant de parler plus spécifiquement de ce projet de recherche, quelques aspects généraux devront être mis en place tels que: les caractéristiques générales du genre *E. coli*, les caractéristiques des souches (UPEC) et les différentes techniques qui peuvent être utilisées lors de l'étude de l'expression génique. Par la suite, les techniques telles que SCOTS, les biopuces à ADN et la qRT-PCR seront expliquées plus en détails. Finalement, le protocole expérimental de l'expérience effectuée, les résultats et l'analyse de ces derniers viendront mettre en lumière les nouvelles informations apportées par ce projet de recherche.



1.1 Escherichia coli

1.1.1 Les caractéristiques générales

Les bactéries du genre Escherichia coli font partie de la famille des Enterobacteriaceae (entérobactéries) et sont caractérisées par leur forme de bacilles droits Gram négatifs, possédant des flagelles péritriches, à anaérobies facultatives et qui ont, en général, des besoins nutritifs simples. Comme le nom de la famille dans laquelle elles se retrouvent l'indique (bactéries entériques), ces bactéries sont des résidents de la flore intestinale. E. coli est, sans aucun doute, l'un des microorganismes le plus étudié et utilisés en laboratoire (Prescott, Harley et Klein, 1995). Il a acquis par transfert horizontal, au fil du temps, des gènes de virulence qui lui ont permis d'entrer dans un hôte, de le coloniser et de causer des maladies, ce qui fait de lui, aujourd'hui, un pathogène redoutable. Ces gènes de virulence ont été véhiculés soit par des plasmides, soit par des bactériophages ou encore par des îlots de pathogénicité² (PAIs) (section 1.2.2) (Dozois et Curtiss, 1999; Picard et al., 1999). La taille des génomes des souches commensales est donc plus petite que celle des souches pathogènes qui ont acquis des gènes de virulence (figure 1.1) (Boyd et Hartl, 1998; Zhang, Foxman et Marrs, 2002).

Par exemple, la figure 1.1 fait la comparaison entre le génome de deux souches pathogènes et une souche non pathogène d'*E. coli*. Il est clairement démontré que 74% (3189 protéines en commun/4288 protéines totales chez *E. coli* K-12) du génome de la souche non pathogène est identique au génome de la souche uropathogène.

² Intégration d'un grand bout d'acide désoxyribonucléique (ADN) dans une région chromosomique (site internet #5).

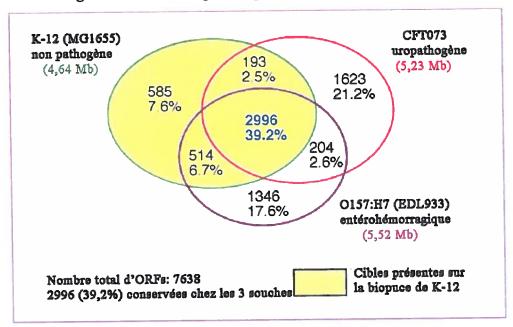


Figure 1.1 Diversité génomique de trois souches de E. coli.

Les différentes valeurs correspondent au nombre de cadres de lecture ouvert (ORFs) pour chaque souche ou groupe de souches. Les pourcentages correspondent au nombre d'ORFs de chaque catégorie par rapport au nombre total d'ORF. Tiré et adapté de Welch et al. 2002.

Les souches commensales permettent de conférer une résistance chez l'hôte lors de la colonisation par d'autres souches pathogènes. Elles ne possèdent pas les facteurs de virulence de ces derniers. Toutefois, elles peuvent être impliquées au niveau d'infections extra-intestinales dues à la présence de corps étrangers tels que les cathéters urinaires, lorsque la barrière gastro-intestinale est brisée (comme lors de péritonites³) ou encore lorsque l'hôte est immunodéprimé (Russo et Johnson, 2003; Kaper, Nataro et Mobley, 2004). À cause de l'acquisition de ces PAIs, certaines souches pathogènes peuvent provoquer des gastroentérites (infections intestinales) ou encore des infections extra-intestinales comme des septicémies⁴, des méningites néonatales et des infections au niveau des voies urinaires tel qu'il en sera discuté dans les lignes qui suivent (Dozois et Curtiss, 1999; Clermont, Bonacorsi et Bingen, 2000).

³ Inflammation aiguë ou chronique du péritoine à la suite d'une infection par perforation d'un viscère tel que l'estomac (site internet #5).

⁴ Infection caractérisée par la dissémination, par voie sanguine, de microorganismes pathogènes à partir d'un foyer infectieux primitif et par des manifestations générales graves (site internet #5).

1.1.2 Les E. coli pathogènes

Tel que mentionné précédemment, plusieurs souches du genre *E. coli* sont reconnues comme étant commensales, mais plusieurs autres constituent une variété de souches pathogènes, qui ont été classées en sept grands groupes ou pathotypes⁵: EPEC, EHEC, ETEC, EIEC, EAEC, DAEC et les ExPEC (Pupo *et al.*, 1997; Dozois et Curtiss, 1999; Kaper, Nataro et Mobley, 2004; Marrs, Zhang et Foxman, 2005).

Parmi ces sept différents pathotypes de E. coli pathogènes, les six premiers groupes sont des pathogènes intestinaux (IPEC) (Russo et Johnson, 2003; Dobrindt, 2005) et sont responsables de maladies diarrhéiques qui sévissent dans le monde entier. Les souches d'E. coli entéropathogènes (EPEC) sont reconnues pour la destruction localisée des microvillosités de l'intestin en s'attachant aux entérocytes (cellules épithéliales cylindriques de la muqueuse intestinale). Elles ont été les premières souches reconnues pour leur implication au niveau des diarrhées chez les enfants. Elles sont aussi la cause de diarrhées chez les animaux. Les E. coli entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de colites hémorragiques et du syndrome urémique hémolytique. Les E. coli entérotoxigéniques (ETEC) sont la cause de diarrhées chez les enfants dans les pays en voie de développement et chez les voyageurs. Elles sont aussi la cause de diarrhée suite au sevrage porcin. Les souches d'E. coli entéroinvasives (EIEC) provoquent la diarrhée sous forme dysentérique et invasive chez les humains et chez les primates (Nataro et al., 1994; Pupo et al., 1997; Dozois et Curtiss, 1999; Kaper, Nataro et Mobley, 2004). Les EIEC sont des souches intracellulaires à cause de leur capacité d'envahir et de se répliquer à l'intérieur des cellules épithéliales et des macrophages (Kaper, Nataro et Mobley, 2004). Finalement, les souches d'E. coli entéroaggrégatives (EAEC) et d'adhérence diffuse (DAEC) sont responsables de diarrhées persistantes, entre autres, chez les enfants (Nataro et al., 1994; Beinke et al., 1998; Kaper, Nataro et Mobley, 2004).

⁵ Souches d'une espèce bactérienne donnée qui possèdent un ensemble de facteurs de virulence nécessaire à un processus de pathogenèse particulier (Marrs, Zhang et Foxman, 2005).

Certaines bactéries du genre *E. coli* peuvent coloniser l'extérieur de l'intestin, comme c'est le cas des *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) qui constituent le dernier groupe de *E. coli* pathogènes. Parmi ces derniers, on retrouve les *E. coli* associés aux méningites néonatales (NEMEC) et ceux associés aux septicémies (SEPEC) chez l'homme et les animaux. Plusieurs ExPEC sont responsables de maladies chez les animaux comme les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) qui sont responsables d'infections telles que l'aérosacculite et la cellulite aviaire chez la volaille. On retrouve également des diarrhées chez les lapins causées par des *E. coli* entéropathogènes de lapins (REPEC) ou encore des maladies oedémiques causées par d'autres souches de *E. coli* (Dozois et Curtiss, 1999; Russo et Johnson, 2003). Les *E. coli* pathogènes du tractus urinaire (UPEC) sont aussi un sous-groupe d'ExPEC dont une section leur sera consacrée plus loin puisqu'elles constituent le sujet principal du présent projet de recherche.

Foxman et ses collaborateurs ont tenté de diviser les UPEC en pathotypes (tout comme les IPEC) en évaluant la présence ou l'absence de 10 facteurs de virulence. Ils ont été en mesure de cibler quelques facteurs qui semblaient quasi indissociables au niveau de la virulence. Toutefois, ils ont conclu qu'il sera nécessaire de découvrir de nouveaux gènes impliqués dans la pathogénicité des UPEC et évaluer leur distribution et leur occurrence afin de mieux définir les différents pathotypes qui pourrait être retrouvés chez les UPEC (Marrs, Zhang et Foxman, 2005).

1.1.3 La classification sérologique

Préalablement à l'émergence de la biologie moléculaire et à l'identification génétique des facteurs de virulence, les antigènes bactériens de surface ont été utilisés afin de distinguer les différentes souches de *E. coli* et d'analyser les liens entre elles. Le sérotypage (O:H:K) a longtemps été utilisé puisqu'il était considéré comme l'unité de la structure de la population. Développé par Kauffman dans les années 1940, le sérotype est basé sur la nature antigénique de trois groupes de constituants de la paroi cellulaire: les lipopolysaccharides (O), les flagelles (H) et la capsule (K) (Prescott, Harley et Klein, 1995; Whitfield et Roberts, 1999; Salyers et Whitt, 2002). Les lipopolysaccharides (LPS)

sont constitués de trois parties: le lipide A, le polysaccharide central et la chaîne latérale O ou antigène somatique O. Ce dernier est composé d'une chaîne de sucres particuliers dont la composition varie d'une souche bactérienne à une autre. Les flagelles sont aussi composés de trois parties: le corps basal qui est le point d'ancrage dans la cellule, le filament qui est la partie visible du flagelle constitué de plusieurs sous-unités d'une protéine nommée flagelline et le crochet qui lie le corps basal au filament. Finalement, la capsule est une couche supplémentaire, retrouvée à l'extérieur de la paroi cellulaire, qui est composée principalement de polysaccharides et d'autres substances chez certaines souches (Prescott, Harley et Klein, 1995). Les différents groupes sérologiques dépendent donc des variations au niveau de la composition des sucres, de la spécificité des liens entre ces derniers et de la substitution des sucres par des résidus autres que des hydrates de carbone (Whitfield et Roberts, 1999). Le sérogroupe d'une souche est représenté par l'antigène O tandis que le sérotype réfère aux trois antigènes (O:H:K) (Warren, 1996).

Le sérotypage consiste en des réactions entre ces antigènes et des anticorps spécifiques. Par exemple, dans le cas de l'antigène O, on retrouve plus de 167 variants, pour l'antigène K, plus de 80 variants et finalement, pour l'antigène H, un peu plus de 56 variants. La structure clonale est donc devenue une donnée importante lors de l'étude des éléments de pathogénicité, lors du diagnostic des maladies et lors de l'identification de la source d'infection (Ochman et Selander, 1984b; Prescott, Harley et Klein, 1995; Donnenberg et Welch, 1996; Whitfield et Roberts, 1999; Salyers et Whitt, 2002). Il existerait plus de 50 000 sérotypes différents (Donnenberg et Welch, 1996).

1.1.4 La distribution phylogénétique et la collection ECOR

La collection ECOR (<u>E. coli</u> reference collection) est composée de 72 souches de <u>E. coli</u> isolées de différents hôtes (humains et animaux) et de provenances géographiques diverses, considérées comme des représentantes de la variation génétique du genre <u>E. coli</u> (Ochman et Selander, 1984a). De précédentes études phylogénétiques avaient permis de démontrer que les différentes souches de <u>E. coli</u> pouvaient être divisées en cinq groupes phylogénétiques: A, B1, B2, D et E (Herzer et al., 1990; Boyd et Hartl, 1998). De ces 72

souches, quatre se sont retrouvées dans le groupe E n'ayant pu être classifiées (Clermont, Bonacorsi et Bingen, 2000). Afin de les classifier, les 72 souches ont été caractérisées à l'aide la technique du « multilocus enzyme electrophoresis » (MLEE) qui permet l'étude de la mobilité électrophorétique relative des variants alléliques de 38 enzymes métaboliques ou encore par une technique d'analyse des séquences d'ADN des gènes conservés nommée « multilocus sequence typing » (MLST) (Herzer et al., 1990; Johnson et al., 2001; Noller et al., 2003). Ensuite, Bingen et ses collaborateurs (2000) ont classifié les souches de la collection ECOR en groupes phylogénétiques grâce à une technique de réaction de polymérase en chaîne (PCR) triplex. Cette technique de PCR est, en fait, une PCR habituelle où la recherche de deux gènes connus (chuA et yjaA) et d'un fragment d'ADN anonyme permet de regrouper de façon phylogénétique les souches de la collection ECOR (Clermont, Bonacorsi et Bingen, 2000).

Le groupe A comprend la souche de laboratoire *E. coli* K-12 et des souches apparentées à celle-ci provenant d'hôtes et de sources cliniques diverses. Plusieurs souches du groupe B1 ont été isolées de mammifères non primates provenant de plusieurs sources géographiques tandis que celles du groupe B2 et quelques-unes du groupe D ont une origine humaine et d'autres primates (Herzer et al., 1990; Boyd et Hartl, 1998). Les souches UPEC et celles responsables d'autres infections extra-intestinales appartiennent en grande majorité au groupe B2 et dans quelques cas, au groupe D. Les souches du groupe D ne possèdent que quelques facteurs de virulence comparativement aux souches du groupe B2 qui sont hautement virulentes. Les souches commensales, quant à elles, se retrouvent surtout dans le groupe A et B1 qui ne possèdent pas les facteurs de virulence nécessaires aux souches extra-intestinales (Lecointre et al., 1998; Picard et al., 1999; Clermont, Bonacorsi et Bingen, 2000; Zhang, Foxman et Marrs, 2002).

Tel que mentionné dans le paragraphe précédent, les souches UPEC font partie du groupe phylogénétique B2 qui sont hautement virulentes (Lecointre et al., 1998; Picard et al., 1999; Clermont, Bonacorsi et Bingen, 2000; Zhang, Foxman et Marrs, 2002). Étant donné qu'elles constituent le sujet principal du présent projet de recherche, la prochaine section leur sera entièrement consacrée afin de survoler les infections causées par les UPEC, les

facteurs de virulence de ces souches, les facteurs de résistance de l'hôte et les différents modèles d'infection utilisés en recherche.

1.2 Les caractéristiques des souches UPEC

Les infections du tractus urinaire (ITU) sont causées dans 75 à 90% des cas par des bactéries du genre *E. coli* (Gupta, Scholes et Stamm, 1999; Schilling *et al.*, 2001). Les ITU constituent les infections les plus fréquemment rencontrées dans les pays industrialisés (Hacker, 2000). Il a été évalué que 60% des femmes vont souffrir d'une ITU au moins une fois au cours de leur vie (Mulvey, 2002).

1.2.1 Les infections causées par les UPEC

L'infection ascendante est la route la plus communément utilisée par les UPEC. Elle s'effectue en deux étapes: le passage des pathogènes de l'ouverture de l'urètre vers la vessie et ensuite, de la vessie vers les reins en passant par les uretères (figure 1.2). Les bactéries causant les ITU proviennent souvent de la flore fécale chez la femme. Elles colonisent ensuite, la région vaginale pour finalement pénétrer dans l'hôte par l'urètre. Les ITU hématogènes (de source sanguine) ou descendantes constituent un faible pourcentage d'ITU qui vont infecter les reins. Ces dernières sont plutôt causées par des espèces microbiennes telles que Staphylococcus aureus, Salmonella spp. et Candida spp. (Warren, 1996). D'autres espèces bactériennes peuvent être responsables d'ITU: Staphylococcus saprophyticus, Enterococcus faecalis, Klebsiella pneumoniae, Proteus mirabilis et Pseudomonas aeruginosa (Kau, Hunstad et Hultgren, 2005).

Les manifestations cliniques associées aux ITU se présentent généralement sous trois formes: les cystites, les pyélonéphrites aiguës et les bactériuries asymptomatiques. Le terme cystite implique une inflammation au niveau de la vessie, mais cette inflammation peut aussi toucher l'urètre (urétrite). Les cystites sont caractérisées par des dysuries (trouble ou difficulté de la miction), de fréquentes et urgentes envies d'uriner et dans quelques cas, des douleurs suspubiennes. Ce type d'infection est celui qui est diagnostiqué dans 95% des cas d'ITU et il ne suffit que de $\geq 10^3$ unités formatrices de colonies (UFC)/ml d'urine, en plus des symptômes mentionnés plus tôt, pour le

⁶ Présence de très grandes quantités de bactéries dans l'urine fraîchement émise (site internet #5).

confirmer. Les pyélonéphrites aiguës procurent, quant à elle, des douleurs au niveau du flanc, de la fièvre et bien souvent des nausées, des vomissements, des sueurs et d'autres malaises. Les manifestations cliniques d'une cystite peuvent aussi être observées lors de cas de pyélonéphrites. Le terme pyélonéphrite réfère plus spécifiquement à l'inflammation des reins. Un taux de $\geq 10^4$ UFC/ml d'urine est retrouvé chez les patients présentant les symptômes de pyélonéphrites aiguës. Les bactériuries asymptomatiques sont caractérisées, comme le nom l'indique, par l'absence de symptômes. Les bactéries peuvent se retrouver autant dans la vessie que dans les reins. À cause des problèmes plus sérieux entourant l'infection des reins, le diagnostic de ce type d'infection nécessite deux cultures consécutives d'urine présentant $\geq 10^5$ UFC/ml du même organisme (Warren, 1996; Mulvey, 2002).

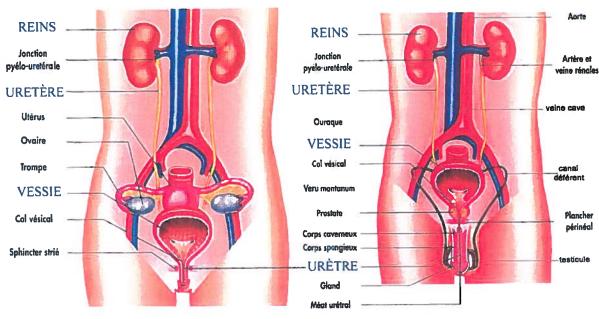


Figure 1.2 Appareils génito-urinaires de la femme et de l'homme

Tiré et modifié du site internet #3.

Les personnes les plus affectées par les ITU sont les femmes à cause de la morphologie de leur appareil génital (urètre plus court) et de la proximité de l'anus et du méat urinaire. De plus, les femmes sexuellement actives courent davantage de risques de contracter une ITU comparativement aux femmes qui s'abstiennent de toute activité sexuelle. Les

nouveaux-nés, les enfants et les personnes âgées constituent d'autres groupes à risque à cause du caractère immunodéprimé de leur système immunitaire. De plus, chez les jeunes enfants aux couches, les contacts entre la matière fécale et l'entrée du système urinaire sont très fréquents. Les complications associées aux ITU sont les bactériémies⁷, les méningites néonatales et les septicémies (Warren, 1996; Mulvey, 2002).

Les ITU sont normalement traitées en utilisant des agents antimicrobiens tels que les βlactames, la triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX), la nitrofurantoïne, la fosfomycine et les fluoroquinolones (Gupta, Scholes et Stamm, 1999). Toutefois, le phénomène de résistance découlant de la pression sélective engendrée par l'utilisation abusive des antibiotiques en médecine (humains et animaux), en nutrition et en agriculture est venu compliquer le traitement des ITU (von Baum et Marre, 2005). La lutte contre les UPEC est devenue difficile à cause de la résistance de ces derniers pour l'ensemble de ces antibiotiques, mais surtout pour l'un des antibiotiques de choix dans le traitement des ITU: la TMP-SMX. Il a été démontré, en 1996, que la résistance pour la TMP-SMX était de plus de 18% (Gupta, Scholes et Stamm, 1999; von Baum et Marre, 2005). À cause de ces résultats, l'utilisation de la TMP-SMX a été limitée aux endroits où le taux de résistance ne dépassait pas un certain seuil (10% ou 20% selon le cas). Les fluoroquinolones ont été utilisées en remplacement de la TMP-SMX à cause du faible taux de résistance observé (von Baum et Marre, 2005). Toutefois, l'observation d'un taux de 36 % de résistance aux fluoroquinolones lors de traitement d'ITU observée en Grèce (Chaniotaki et al., 2004) pourrait entraîner l'augmentation de l'utilisation d'antibiotiques tels que la nitrofurantoïne et la fosfomycine (von Baum et Marre, 2005).

1.2.2 Les facteurs de virulence des UPEC

Tel que mentionné dans la section 1.1.1, les PAIs sont des régions qui codent pour des facteurs de virulence chez les souches pathogènes (Hacker et Kaper, 2000). Le terme « îlots de pathogénicité » a été utilisé pour la première fois en 1990 (Hacker et al., 1990) et la présence de ces îlots avait été observée chez des pathogènes humains de la famille

⁷ Présence de bactéries dans le sang (site internet #5).

des Enterobacteriaceae. De nos jours, il est connu que l'on peut les retrouver également chez d'autres bactéries pathogènes, chez les animaux et les plantes. Les PAIs peuvent coder pour un ou plusieurs facteurs de virulence et ne sont présents que chez les souches pathogènes. Les PAIs sont de larges régions d'ADN chromosomique qui peuvent couvrir de 10 à 200 kb. Ils peuvent aussi être retrouvés sur les plasmides et dans le génome des bactériophages. Les régions d'ADN qui constituent les PAIs diffèrent dans leur contenu en G+C par rapport au reste du génome du pathogène. De plus, elles sont flanquées de petites séquences directement répétées et elles sont associées aux gènes codant pour l'acide ribonucléique de transfert (ARNt) qui constitue le site d'intégration des PAIs. Ce dernier point vient mettre en lumière l'acquisition des PAIs par transfert horizontal au cours de l'évolution. Les PAIs contiennent aussi des gènes fonctionnels ou cryptiques qui codent pour des facteurs de mobilité tels que des intégrases, des transposases et des éléments d'insertion de séquence (IS) (Hacker et Kaper, 2000; Kaper, Nataro et Mobley, 2004). Les génomes des UPEC, et des autres pathogènes, sont donc constitués d'un squelette de gènes conservés, qui codent pour des produits impliqués dans les processus cellulaires essentiels. En plus de ces derniers, ils possèdent un ensemble flexible de gènes qui, non seulement ne sont pas retrouvés chez toutes les souches, mais qui confèrent des propriétés additionnelles aux souches qui les possèdent (Dobrindt, 2005).

Il existe plusieurs classes de facteurs de virulence associés aux UPEC dont certains sont codés par des PAIs. Les facteurs de virulence connus retrouvés chez les UPEC sont: les facteurs d'adhésion, les toxines, les systèmes de capture du fer, les polysaccharides de la capsule, la résistance au sérum, le sérotype et la formation de biofilms. La section qui suit porte sur les caractéristiques principales de ces facteurs et de leur contribution au niveau de la pathogénicité des UPEC. Il faut toutefois garder en mémoire que c'est la combinaison de plusieurs de ces facteurs qui est responsable de la virulence accrue de certaines souches UPEC.

1.2.2.1 Les facteurs d'adhésion

Les bactéries ont développé plusieurs mécanismes afin contrer le système de défense de l'hôte. Par exemple, elles ont acquis la capacité de s'attacher aux différentes structures de l'hôte afin de ne pas être éliminées par les fluides naturels du corps (urine, surfaces muqueuses, contenu intestinal) (Johnson, 1991; Bower, Eto et Mulvey, 2005). Plusieurs facteurs d'adhésion sont responsables de la persistance des UPEC dans le tractus urinaire:

1.2.2.1.1 Les fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont exprimés par la majorité des UPEC et d'autres genres bactériens pathogènes et commensaux (y compris E. coli) (Mulvey et al., 1998; Bower, Eto et Mulvey, 2005). Les fimbriae de type 1 sont codés par les gènes fim (8 gènes). Constitués principalement de répétitions de sous-unités FimA, ces fimbriae sont de forme cylindrique et hélicoïdale de 7 nanomètres (nm) d'épaisseur et de 1 à 2 micromètres (µm) de longueur. La protéine FimH, située au bout du fimbriae, est l'adhésine dont le domaine N-terminal va lier les récepteurs glycoprotéiques contenant des résidus de mannose exprimés par l'épithélium de la vessie (Mulvey et al., 1998; Martinez et al., 2000; Mulvey, 2002; Bergsten, Wullt et Svanborg, 2005; Le Bouguenec, 2005). Les fimbriae de type 1 sont davantage associés aux cas de cystites (Kaper, Nataro et Mobley, 2004). Les souches UPEC expriment des variants de la protéine FimH qui se lient aux récepteurs glycoprotéiques contenant des résidus mono-mannose et tri-mannoses tandis que les souches commensales (et fécales) d'E. coli vont plutôt se lier aux tri-mannoses (Mulvey, 2002; Bergsten, Wullt et Svanborg, 2005; Bower, Eto et Mulvey, 2005). Les fimbriae de type 1 peuvent aussi se lier à la laminine, la fibronectine, le collagène et même les surfaces abiotiques (Schembri, Christiansen et Klemm, 2001; Schembri et Klemm, 2001). En plus de promouvoir l'interaction entre la bactérie et l'hôte, les fimbriae de type 1 permettraient d'établir des contacts entre les bactéries et de stimuler leur autoaggrégation afin qu'elles forment des biofilms (Schembri et Klemm, 2001). La formation de biofilms pourrait avoir son importance dans la capacité des UPEC de résister aux traitements par antibiotiques et de contrer les défenses de l'hôte lors d'ITU en plus de permettre la colonisation de cathéter au niveau des voies urinaires ou d'autres implants médicaux (section 1.2.2.7) (Mulvey, 2002).

Les fimbriae de type 1 ne joueraient pas uniquement un rôle d'adhérence, mais aussi un rôle au niveau de l'invasion de l'épithélium du tractus urinaire. À l'aide du modèle murin de cystites, Mulvey et ses collaborateurs ont démontré qu'une sous-population d'UPEC exprimant les fimbriae de type 1, inoculée dans la vessie, pouvait envahir l'épithélium de l'hôte. Cette invasion leur conférait un avantage au niveau de la survie par rapport aux UPEC qui demeuraient dans l'espace extracellulaire. L'étude de vessies de souris infectées par des souches exprimant les fimbriae de type 1 et des mutants isogéniques (adhésine FimH manquante) a permis de conclure que l'expression des fimbriae permettait d'induire des changements localisés à la surface des cellules de l'hôte au niveau du point de contact avec ce dernier (Mulvey et al., 1998). Dans une autre étude, Martinez a démontré que l'adhésine FimH fonctionnait comme une invasine en induisant un réarrangement localisé du cytosquelette d'actine des cellules de l'hôte grâce à l'activation de cascades de signalisation préexistantes chez celui-ci (Martinez et al., 2000). L'utilisation de la technique « signature-tagged mutagenesis » (STM) et du modèle murin d'infection ascendante du tractus urinaire ont été utilisés par Bahrani-Mougeot et al. afin d'identifier les gènes essentiels à la survie des UPEC dans le tractus urinaire des souris. Ils ont déterminé qu'une mutation au niveau des gènes codant pour les fimbriae de type 1 engendrait une atténuation de la colonisation du tractus urinaire. Cette atténuation était observable également dans le cas de mutations au niveau des gènes en amont de l'opéron fim qui affectaient la variation de phase (l'expression ou non des fimbriae type 1) (Lim et al., 1998; Bahrani-Mougeot et al., 2002). Récemment, il a été démontré que l'expression des fimbriae de type 1 contrôlait l'expression des autres fimbriae. Les résultats obtenus, suite à une analyse par biopuces, ont suggéré que l'expression des fimbriae P était réprimée lorsque l'expression des fimbriae de type 1 était induite (Snyder et al., 2005).

1.2.2.1.2 Les fimbriae P

Les fimbriae P, codés par les gènes pap (pyelonephritis-associated pili) (11 gènes) ou prs (pap-related sequences) (Stromberg et al., 1990; Stromberg et al., 1991; Blanco et al., 1997; Feria et al., 2001; Mulvey, 2002; Bergsten, Wullt et Svanborg, 2005; Le Bouguenec, 2005), se retrouvent sur les PAIs de souches du groupe phylogénétique B2 et D principalement (Boyd et Hartl, 1998). Ils sont composés de répétitions de sous-unités PapA qui forment des cylindres hélicoïdaux de 6,8 nm de largeur. Au bout de chaque fimbriae, on retrouve l'adhésine PapG qui reconnaît les récepteurs digalactosides α-Dgalactopyranosyl-β-D-galactopyranoside (Gala(1-4)Gal/antigènes du groupe sanguin P) présents sur des glycolipides (GbO3/globotriasylcéramide) exprimés par les érythrocytes et les cellules rénales de l'hôte (Stromberg et al., 1990; Stromberg et al., 1991; Feria et al., 2001; Mulvey, 2002; Wullt, 2003; Bergsten, Wullt et Svanborg, 2005). Ce dernier point a permis d'associer ce facteur de virulence avec les cas de pyélonéphrites (Stromberg et al., 1990; Stromberg et al., 1991; Feria et al., 2001; Mulvey, 2002; Kaper, Nataro et Mobley, 2004). L'addition d'un résidu N-acétyl-galactosamine (GalNAc) au récepteur digalactoside génère le globoside (GbO4) et l'addition de deux de ces résidus génère l'antigène de Forsmann (GbO5). Les différents variants de l'adhésine PapG désignés PapGI, PapGII et PapGIII ont été reconnus pour se lier au GbO3, GbO4 et GbO5 respectivement. Les différents variants de PapG joueraient un rôle au niveau de la spécificité de l'hôte pour les différentes souches d'UPEC (Stromberg et al., 1990; Stromberg et al., 1991; Feria et al., 2001; Mulvey, 2002; Wullt, 2003; Westerlund-Wikstrom et Korhonen, 2005). Entre autres, les variants PapGI (adhésine papG₁₉₆) et PapGII (adhésine papGIA2) seraient associés aux cas de pyélonéphrites et le variant PapGIII (adhésine prs_{GJ96}) aux cas de cystites, de bactériuries asymptomatiques et d'ITU chez les chiens et les chats (Daigle et al., 1994; Wullt, 2003; Johnson et Russo, 2005). Le variant PapG1 est un variant non commun et atypique chez les isolats cliniques (Wullt, 2003). Les gènes codant pour les fimbriae P sont souvent associés aux gènes codant pour l'hémolysine (section 1.2.2.2.1) et le facteur nécrotique cytotoxique 1 (CNF1/cytotoxic necrotizing factor 1) (section 1.2.2.2.2). Il a donc été conclu que la co-présence de ces facteurs de virulence devaient apporter un avantage au niveau de la virulence des souches qui les possédaient (Hacker et Kaper, 2000).

Une étude sur des singes a permis de démontrer que l'adhésine PapG était non nécessaire à la colonisation de la vessie, mais qu'elle devenait essentielle lors de l'adhésion aux tissus rénaux par des souches isolées de cas de pyélonéphrites (Roberts et al., 1994). Par la suite, il a été démontré que les fimbriae P augmentaient la colonisation du tractus urinaire chez l'homme par une souche UPEC connue pour causer une bactériurie asymptomatique (Wullt et al., 2000). Les fimbriae P se lient très faiblement aux cellules épithéliales de la vessie (Donnenberg et Welch, 1996).

1.2.2.1.3 Les fimbriae S et F1C

Les fimbriae S sont composés d'une sous-unité majeure SfaA (Sfa pour S afimbrial adhesin/fimbriae S afimbriaire) et de trois sous-unités mineures SfaG, SfaH et SfaS. La sous-unité SfaS, située au bout du fimbriae, permet l'interaction entre la bactérie et les résidus d'acide sialique des récepteurs exprimés par les cellules des reins et les cellules vasculaires endothéliales. De plus, elle permet l'adhésion aux glycolipides des cellules endothéliales (Blanco et al., 1997; Mulvey, 2002). Les fimbriae S auraient un rôle à jouer dans la dissémination bactérienne et seraient exprimés par des souches UPEC isolées de cas d'ITU ascendantes, de pyélonéphrites, de septicémies et de méningites (Hacker et al., 1993; Mulvey, 2002). Les adhésines Sfa sont retrouvées exclusivement chez les souches du groupe phylogénétique B2 (Bingen et al., 1998; Boyd et Hartl, 1998).

Les fimbriae F1C, codés par les gènes *foc*, sont des homologues génétiques des fimbriae S, mais leurs récepteurs sont les suivants: les résidus β-GalNac1, 4β-Gal des glycolipides exprimés sur les tubules distaux des cellules épithéliales des reins, les tubes collecteurs des reins et les cellules endothéliales de la vessie et des reins (Riegman *et al.*, 1990; Mulvey, 2002).

1.2.2.1.4 Les fimbriae de la famille Dr

Les fimbriae de la famille Dr comprennent les adhésines Afa/Dr (Afa pour afimbrial adhesin/adhésine afimbriaire) dont les adhésines fimbriaires F1845, Dr et Dr-II et les adhésines non fimbriaires AFA-I, AFA-III (Blanco et al., 1997; Mulvey, 2002; Bower, Eto et Mulvey, 2005; Le Bouguenec, 2005). Chacune d'elles est codée par au moins 5 gènes (de A à E) où le gène E correspond à l'adhésine. Les adhésines Afa/Dr se lient aux antigènes du groupe sanguin Dra qui se retrouvent sur le facteur accélérateur de dissociation (DAF/decay accelerating factor) (ou CD55) (Bower, Eto et Mulvey, 2005; Le Bouguenec, 2005). Les adhésines de la famille Dr reconnaissent une ou plusieurs des quatre petites séquences consensus de 60 acides aminés présentes dans le DAF. Le DAF est une protéine membranaire cellulaire qui permet la régulation de la cascade du complément et qui prévient la lyse des érythrocytes par le complément (Johnson, 1991; Mulvey, 2002; Bower, Eto et Mulvey, 2005; Le Bouguenec, 2005). Les UPEC exprimant les adhésines Dr sont reconnues pour leur capacité de coloniser le tractus urinaire lors d'ITU ascendante et de provoquer des infections récurrentes à cause de leur adhésion aux compartiments interstitiels des reins; ce qui facilite leur persistance à long terme (Goluszko et al., 1997; Nowicki, Selvarangan et Nowicki, 2001; Mulvey, 2002).

Il a été démontré que la liaison des fimbriae Dr au collagène de type IV facilitait la persistance des UPEC dans les compartiments interstitiels des reins dans un modèle murin (Selvarangan et al., 2004). Les adhésines Afa/Dr seraient aussi impliquées au niveau du développement de pyélonéphrites gestationnelles. Durant la grossesse chez l'humain, il y aurait augmentation du DAF, ce qui accroîtrait la colonisation du tractus urinaire par les adhésines Afa/Dr (Goluszko et al., 2001; Hart et al., 2001). Ce phénomène a été confirmé par des études en cultures cellulaires où le taux de colonisation par les adhésines Afa/Dr était proportionnel au taux d'expression du DAF (Selvarangan et al., 2000). En réponse à une infection par des UPEC, l'oxyde nitrique serait produit en abondance. Cette forte production inhiberait l'acide ribonucléique messager (ARNm) du DAF et la synthèse protéique des cellules endométriales, ce qui diminuerait la colonisation bactérienne (Lundberg et al., 1996; Poljakovic et al., 2001).

1.2.2.1.5 L'adhésine Iha

Récemment, une nouvelle adhésine a été identifiée. Le gène *iha* code pour l'adhésine Iha, un homologue de la protéine IrgA retrouvée chez *Vibrio cholerae* Iha est une protéine de la membrane externe codée par un PAI qui a été caractérisée pour la première fois chez la souche *E. coli* O157:H7. Dans une expérience utilisant des cellules HeLa, elle a permis de conférer un phénotype d'adhérence à une souche non adhérente K-12 (Tarr *et al.*, 2000; Bauer *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005). La prévalence de *iha* semble beaucoup plus importante chez les souches ExPEC que chez les souches fécales. De plus, l'importance de la pathogénicité de ce facteur de virulence a été démontrée grâce au modèle murin d'infection ascendante du tractus urinaire et à des tests in vitro d'adhérence sur des cellules épithéliales de vessie (Johnson *et al.*, 2005).

1.2.2.2 Les toxines

1.2.2.2.1 L'hémolysine

Les souches hémolytiques ont la capacité de produire une toxine cytolytique appelée hémolysine alpha (ou α-hémolysine) qui lyse les érythrocytes de l'ensemble des mammifères et même des poissons (Johnson, 1991; Donnenberg et Welch, 1996; Henderson, Navarro-Garcia et Nataro, 1998; Cortajarena, Goni et Ostolaza, 2003a; Cortajarena, Goni et Ostolaza, 2003b). L'α-hémolysine est membre de la famille RTX (repeats in toxin) qui constituent un groupe de protéines caractérisées par la présence de séquences de nonapeptides répétées en tandem, riches en glycine et en acide aspartique (GGXGXDXUX), près de la région C-terminal de la protéine (Cortajarena, Goni et Ostolaza, 2003a; Cortajarena, Goni et Ostolaza, 2003b). L'hémolysine est codée par un opéron de 4 gènes hlyDABC qui est localisé sur le chromosome dans le cas des souches UPEC isolées des humains et sur un plasmide dans le cas des souches UPEC isolées des animaux. La toxine de 107 kilodaltons (kDa) est codée par le gène hlyA, et elle est sécrétée hors de la cellule en traversant les deux membranes sans subir de lyse ou de clivage du peptide signal. Juste avant d'être sécrétée, les séquences répétées en C-

terminal de la protéine HlyA lui permet d'être activée par la protéine HlyC qui reconnaît ces séquences. Le mode d'action de l'α-hémolysine consiste en la création de canaux à cations de 2 nm dans la membrane lipidique des érythrocytes. Ces canaux permettent le passage d'ions et d'autres molécules tels que le calcium²+ (Ca²+), le potassium+ (K+), le mannitol et le sucrose. L'hémolysine est responsable d'inflammation, de bris de tissus chez l'hôte et du débalancement du système de défense de l'hôte. En effet, les monocytes et les granulocytes sont très susceptibles à l'activité cytolytique de l'hémolysine. De plus, elle stimule le relâchement d'anion superoxyde et de peroxyde d'hydrogène et la consommation d'oxygène par les cellules des tubules rénaux. La libération d'histamine par les mastocytes et les basophiles est une autre conséquence de l'activité de l'hémolysine. Chez l'humain, la production d'hémolysine par les souches UPEC corrèle avec les formes les plus sévères d'ITU comme les pyélonéphrites (Johnson, 1991; Donnenberg et Welch, 1996; Henderson, Navarro-Garcia et Nataro, 1998; Cortajarena, Goni et Ostolaza, 2003a; Cortajarena, Goni et Ostolaza, 2003b).

1.2.2.2.2 Le facteur nécrotique cytotoxique (CNF1)

Le facteur nécrotique cytotoxique 1 (CNF1/cytotoxic necrotizing factor 1) est une exotoxine invasive de 113 kDa. Elle est, tout comme l'α-hémolysine (section 1.2.2.6), encodée par le PAI II des UPEC (Donnenberg et Welch, 1996; Landraud et al., 2004; Bower, Eto et Mulvey, 2005). Les souches UPEC hémolytiques expriment, dans plusieurs cas, le CNF1 (Donnenberg et Welch, 1996; Landraud et al., 2000; Davis, Rasmussen et O'Brien, 2005). Le CNF1 est une protéine, isolée de cas de diarrhées infantiles, qui a été caractérisée pour la première fois en 1983. Des effets nécrotiques sur des cellules cutanées de lapins et des effets cytotoxiques sur des cellules HeLa lui avaient alors été attribués (Caprioli et al., 1983). Lorsque la toxine CNF1 est mise en contact avec des cellules en culture, il y a réorganisation des microfilaments d'actine grâce à l'induction de guanosine triphosphatases (GTPases) de la famille Rho. Les protéines RhoA, Rac1 et Cdc42 sont des GTPases qui jouent un rôle majeur de régulatrices au niveau de l'organisation du cytosquelette d'actine des cellules eucaryotes (Fiorentini et al., 1997; Boquet, 2000; Landraud et al., 2000; Rippere-Lampe et al., 2001b; Emody, Kerenyi et

Nagy, 2003; Landraud et al., 2004; Bower, Eto et Mulvey, 2005; Davis, Rasmussen et O'Brien, 2005), de la phagocytose et de la génération d'oxygène réactif par les polymorphonucléaires (PMNs) (Davis, Rasmussen et O'Brien, 2005). L'activation des GTPases s'effectue dans le cytosol de la cellule par la désamidation d'un résidu glutamine de la GTPase qui rend cette dernière constitutivement active (Fiorentini et al., 1997; Boquet, 2000; Landraud et al., 2000; Rippere-Lampe et al., 2001b; Emody, Kerenyi et Nagy, 2003; Davis, Rasmussen et O'Brien, 2005). La liaison entre le CNF1 et les précurseurs des récepteurs de laminine situés à la surface de la cellule permet l'entrée de la toxine dans des endosomes. L'environnement acide de l'endosome va permettre l'injection du domaine catalytique de la toxine dans le cytosol afin de modifier la GTPase (Landraud et al., 2004). L'induction du froncement de la membrane, la formation de cellules multinucléées et l'activité phagocytaire de cellules en culture sont quelques effets résultants de cette activation (Landraud et al., 2004). L'induction d'une activité phagocytaire par le CNF1 doit, plus particulièrement, permettre au pathogène de coloniser les cellules uroépithéliales tout en le protégeant de la réponse immunitaire de l'hôte (Landraud et al., 2000; Landraud et al., 2004). De plus, l'induction d'une activité macropinocytique⁸ chez les cellules épithéliales, l'interférence avec la migration transépithéliale des PMNs, l'induction de l'apoptose des cellules épithéliales, la modification de la perméabilité de l'épithélium de certaines cellules et le changement dans l'activité de la phagocytose des macrophages humains sont quelques autres effets qui ont été remarqués (Boquet, 2000; Emody, Kerenyi et Nagy, 2003). Il semblerait que la production du CNF1 soit indépendante de l'origine de la souche: isolée de cas de cystites ou des pyélonéphrites, d'ITU nocosomiales ou acquises dans la communauté ou encore provenant du stade précoce ou tardif de la maladie (Landraud et al., 2000).

Des études épidémiologiques ont démontré le lien entre l'expression du CNF1 par les UPEC et l'augmentation de la virulence et du développement d'ITU (Blanco et al., 1992; Goullet et al., 1994; Foxman et al., 1995). Yamamoto et ses collaborateurs ont déterminé qu'une plus grande proportion d'UPEC exprimait le CNF1 comparativement aux souches commensales (Yamamoto et al., 1995). Par la suite, des expériences chez les souris,

⁸ La pinocytose implique l'entrée de molécules dans la cellule (site internet #5).

utilisant le modèle d'infection ascendante du tractus urinaire, ont démontré que les bactéries mutantes pour le gène codant pour le CNF1 persistaient difficilement lors de l'infection. Le CNF1 permettrait donc aux bactéries de pénétrer profondément dans la couche musculaire de la vessie et de causer ainsi une plus longue et plus sévère infection. De plus, les bactéries exprimant le CNF1 induisaient une réponse inflammatoire aiguë dans la vessie, une colonisation plus importante lors de co-infections (mutants et non-mutants) et survivaient bien lorsque incubées avec des neutrophiles humains (Rippere-Lampe et al., 2001b). Une étude sur les UPEC exprimant le CNF1, dans le modèle de prostatite aiguë chez le rat, a révélé que le CNF1 induisait une forte inflammation de la prostate en plus d'induire une infiltration prononcée des PMNs au site d'infection (Rippere-Lampe et al., 2001a). Récemment, Davis et al. ont démontré que l'expression du CNF1 par des UPEC réprimait la phagocytose, altérait la distribution du récepteur du complément CR3 (CD11b/CD18) (voir section 1.2.3) sur les PMNs et augmentait la respiration intracellulaire suite à des injections intrapéritonéales d'UPEC dans des souris (Davis, Rasmussen et O'Brien, 2005).

1.2.2.2.3 Les autotransporteurs

Les UPEC se sont dotés de systèmes de sécrétion permettant à certains facteurs de virulence de se retrouver dans l'espace extra-cytoplasmique. Parmi ces systèmes, on retrouve les autotransporteurs qui impliquent la translocation d'une protéine à l'extérieur de la membrane externe de la bactérie. Les autotransporteurs sont une famille de protéines qui possèdent toutes la même structure, mais qui ont des fonctions différentes au niveau de la virulence. Ils dirigent leur propre sécrétion à travers la membrane externe de la bactérie (Henderson, Navarro-Garcia et Nataro, 1998). Les autotransporteurs possèdent trois domaines: le domaine N-terminal qui dirige le précurseur vers la membrane interne, le domaine passager qui confère la fonction de la protéine et le domaine C-terminal qui permet la sécrétion de cette dernière au travers de la membrane externe (Henderson, Navarro-Garcia et Nataro, 1998; Henderson et al., 2004).

Une protéine de 107 kDa, exprimée par la souche UPEC CFT073 isolée d'un cas de pyélonéphrite aiguë, a été identifiée. Elle a été nommée Sat (secreted autotransporter toxin/autotransporteur sécréteur de toxine) et elle est codée par le PAI II de la souche UPEC CFT073. Elle fait partie de la famille des autotransporteurs de sérine protéase des Enterobacteriaceae (SPATEs/serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae) puisqu'elle possède une activité de sérine protéase et une séquence d'acides aminés en N-terminal propre aux transporteurs de cette famille (Guyer et al., 2000; Guyer et al., 2002).

Des analyses ont démontré l'activité cytopathique de cet autotransporteur sur des cellules épithéliales de vessie et de rein. Une forte réponse des anticorps suite à des infections expérimentales chez la souris avec la souche sauvage (E. coli CFT073) a aussi été observée. Cet autotransporteur serait codé par un plus grand nombre de souches UPEC que par des souches fécales. De plus, sa localisation sur un PAI viendrait renforcer la fonction de facteur de virulence de cette protéine (Guyer et al., 2000). Sat induirait l'élongation et la perte de jonction cellulaire suite à une incubation avec des cellules Vero de reins. La formation de vacuoles dans le cytoplasme de lignées cellulaires de vessie et de rein humains a aussi été observée d'où la caractéristique de toxine vacuolante qui lui a été attribuée. L'infection ascendante du tractus urinaire de souris par des mutants sat n'a pas permis d'observer des différences au niveau du nombre de bactéries dans l'urine, la vessie ou les reins comparativement aux infections par la souche mutante E. coli CFT073. Malgré ces résultats, des changements histologiques ont quand même été observés au niveau des reins: la dissolution de la membrane glomérulaire et la formation de vacuole au niveau des cellules des tubules proximaux. Ces résultats ont permis de conclure que Sat induisait des dommages au niveau de l'épithélium rénal lors de l'infection supérieure du tractus urinaire et, par le fait même, contribuait à la pathogenèse lors d'ITU (Guyer et al., 2002).

L'autotransporteur Vat (~ 110 kDa) est une autre toxine vacuolante qui est membre des SPATEs. Il a été décrit pour la première fois chez une souche aviaire (APEC) (Parreira et Gyles, 2003). Des observations ont démontré que certaines souches APEC induisaient une activité cytotoxique vacuolante similaire à celle produite par l'autotransporteur VacA

d'Helicobacter pylori (Salvadori et al., 2001). Par la suite, l'autotransporteur Vat a été identifié comme étant responsable d'une activité vacuolante chez une souche d'E. coli isolée d'un cas de septicémie chez le poulet (Parreira et Gyles, 2003). Cet autotransporteur possède une activité protéolytique sur la caséine en plus d'être produite en plus grande quantité à 37°C tout comme PicU (paragraphe suivant). Vat est plus fréquemment retrouvé chez les souches UPEC que chez les souches commensales d'E. coli. De plus, Heimer et al. ont démontré que vat était exprimé chez la souris lors d'une infection expérimentale du tractus urinaire (Heimer et al., 2004).

L'autotransporteur PicU fait aussi partie de la famille des SPATEs. PicU est un homologue de l'autotransporteur sérine protéase Pic identifié chez Shigella flexneri et chez les EAEC (Parham et al., 2004). PicU, une protéine de ~ 115 kDa (Heimer et al., 2004), est produite par la souche UPEC CFT073. PicU semble appartenir à une autre branche des SPATEs puisqu'il ne possède pas d'activité toxique comme l'autotransporteur Sat. Il possède, toutefois, une activité protéolytique (sérine protéase) contre la mucine, la pepsine, le facteur V, la spectrine (Parham et al., 2004) et la caséine (Heimer et al., 2004). Son activité mucinolytique (ou de mucinase) est importante au niveau des ITU. PicU jouerait un rôle pendant l'ITU en brisant la mince couche protectrice de mucine qui tapisse le tractus urinaire (Parham et al., 2004). L'effet du bris de cette couche avait été préalablement étudié. Une augmentation du taux de colonisation du tractus urinaire et une augmentation de la sévérité de la maladie avait alors été observée (Cornish et al., 1988). Heimer et al. a récemment démontré qu'un mutant picU était moins bien adapté à la colonisation du tractus urinaire (Heimer et al., 2004). La prévalence du gène picU semble beaucoup plus importante chez les UPEC comparée aux souches fécales tout comme c'est le cas pour les autres facteurs de virulence tels que les fimbriae P de classe III (prs), les fimbriae S et le CNF1 (Heimer et al., 2004; Parham et al., 2004). L'équipe de Parham a déterminé qu'il n'y avait pas de différences quant à la fréquence de picU dans les cas de pyélonéphrites et de cystites, ce qui suggèrerait l'importance de PicU pour la colonisation du tractus urinaire, mais non pour la progression de l'infection (cystites → pyélonéphrites) (Parham et al., 2004). Toutefois, l'équipe de Heimer a remarqué que cet autotransporteur était davantage codé par les

souches de pyélonéphrites. De plus, il a été observé que la régulation de la transcription de *pic* était température-sensible puisqu'une plus grande quantité d'autotransporteurs était produite à 37°C comparativement à 25°C (Heimer *et al.*, 2004).

1.2.2.3 Les systèmes de capture du fer

Le fer est nécessaire aux UPEC puisqu'ils l'utilisent pour transporter et entreposer l'oxygène, pour la synthèse de l'ADN, pour le transport des électrons et pour le métabolisme du peroxyde. Toutefois, comme le fer est aussi important chez l'humain, il est complexé aux cellules de ce dernier par des protéines chélatrices de fer (transferrine, lactoferrine, érythrocytes), ce qui le rend non disponible pour la bactérie (Johnson, 1991; Russo et al., 2002; Williams et al., 2005). Chez E. coli, il existe plusieurs systèmes de chélation du fer dont les sidérophores et les transporteurs de l'hème.

1.2.2.3.1 L'aérobactine

L'aérobactine, un sidérophore hydroxomate, fait partie des systèmes de chélation du fer les plus efficaces chez les bactéries entériques. L'aérobactine est une petite molécule sécrétée par la bactérie, qui extrait le Fe³⁺ des protéines chélatrices de fer de l'hôte afin de le rapporter à la bactérie. Par rapport aux autres systèmes, l'aérobactine offre de précieux avantages: sa constante d'affinité à pH neutre est beaucoup plus basse, elle est beaucoup plus soluble et stable, elle est continuellement recyclée sans besoin d'être hydrolysée comparativement à l'entérobactine (section 1.2.2.3.2), elle délivre le fer de façon beaucoup plus spécifique au site d'utilisation du fer dans la bactérie et finalement, sa production est stimulée à des taux plus faibles de concentration en fer. L'aérobactine est retrouvée chez des souches UPEC de pyélonéphrites (73% des cas), de cystites (49% des cas), de bactériémies (58% des cas) et de bactériuries asymptomatiques (38% des cas) (Johnson, 1991). Il a été démontré que les souches d'UPEC produisant l'aérobactine étaient plus létales que les souches qui n'en produisaient pas (Montgomerie et al., 1984).

1,2,2,3,2 L'entérobactine

L'entérobactine est un sidérophore de type catécholate. Il a été détecté chez *E. coli* par O'Brien et Gibson en 1970 (O'Brien et Gibson, 1970) et chez *Salmonella enterica* serovar Typhimurium par Pollack et Neilands (Pollack et Neilands, 1970). Il est formé d'une structure trimérique cyclique de 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS). Parmi tous les composés naturels, l'entérobactine est le composé qui possède l'affinité la plus grande pour des ions ferriques (Williams *et al.*, 2005).

IroN est un récepteur de sidérophore de type catécholate dont la prévalence chez les souches UPEC, par rapport aux souches fécales, a été observée. De plus, il semble se retrouver principalement dans le groupe phylogénétique B2 (Russo et al., 1999; Bauer et al., 2002; Russo et al., 2002). Les sidérophores reconnus par IroN sont les entérobactines et les salmochelines (section 1.2.2.3.3). IroN est considéré comme un facteur de virulence puisqu'il augmente la virulence des souches qui le possède lors d'infection ascendante du tractus urinaire de souris (Russo et al., 2002; Negre et al., 2004). Le gène codant pour ce facteur de virulence semble être associé à plusieurs autres gènes tels que prsG_{J96} (section 1.2.2.1.2), sfa (section 1.2.2.1.3), ompT (section 1.2.2.4) et hly (section 1.2.2.2.2). IroN semble avoir été acquis par transfert horizontal grâce à un PAI qui contient les gènes codant pour les fimbriae P et F1C (Bauer et al., 2002). Il a été retrouvé également sur un plasmide transférable chez une souche UPEC (Sorsa et al., 2003).

IreA est une protéine de 75,3 kDa. Elle semble impliquée au niveau de l'acquisition du fer à cause de sa grande similarité (48 à 56%) avec un récepteur de sidérophore. Son expression est plus importante dans l'urine, dans les ascites humains et le sang humain comparativement à un milieu de culture synthétique. Sa prévalence est beaucoup plus grande chez les souches d'E. coli provenant de sang et d'urine contrairement à la prévalence observée chez les souches fécales. Une étude a démontré que l'induction de ireA contribuait beaucoup à la capacité de coloniser la vessie par la souche UPEC CP9

⁹ Présence d'un excès de fluides dans les cavités péritonéales (site internet #5).

dans le modèle d'infection ascendante du tractus urinaire de la souris (Russo, Carlino et Johnson, 2001).

1.2.2.3.3 Les salmochelines

Les salmochelines sont des sidérophores de type catécholate. Elles sont apparentées aux entérobactines (section 1.2.2.3.2). En effet, c'est la glycosylation du groupement principal de l'entérobactine (DHBS), rendant ce dernier plus hydrophile, qui serait à l'origine des salmochelines (Hantke *et al.*, 2003). Les salmochelines sont détectées chez une plus grande proportion de souche UPEC que de souches entéropathogènes (IPEC) (Valdebenito *et al.*, 2005).

1.2.2.3.4 La yersiniabactine

Le sidérophore yersiniabactine est codé par un PAI présent chez les souches de Yersinia. Ce PAI a également été retrouvé intégré dans le gène asnT de l'ARNt de plusieurs pathotypes d'E. coli dont ceux responsables de bactériémies et d'urosepticémies. Une étude sur la distribution et la localisation de ce PAI chez différents groupes phylogénétiques de la collection ECOR a démontré que ce dernier est présent dans 93% des cas chez les souches d'E. coli du groupe B2 et D. Il est aussi présent à 100% chez les souches causant des méningites néonatales, ce qui suggère la présence de ce facteur de virulence lors du développement de ce type de maladie (Clermont, Bonacorsi et Bingen, 2001).

1.2.2.3.5 TonB et ChuA

Un autre moyen, pour la bactérie, d'acquérir le fer consiste à utiliser directement des composés riches en fer de l'hôte tels que l'hème ou l'hémoglobine. Le transport du fer par les sidérophores ou l'hème nécessitent l'utilisation d'un récepteur de la membrane externe et dépend de la protéine TonB et de ces protéines accessoires ExbB et ExbD. La protéine TonB, attachée à la membrane cytoplasmique, donne l'énergie nécessaire aux

récepteurs membranaires pour le transport du fer (Torres et al., 2001). Plusieurs études ont démontré qu'une mutation de tonB, chez des pathogènes Gram-, résultait en un phénotype avirulent chez les modèles animaux (Henderson et Payne, 1994; Jarosik et al., 1994; Tsolis et al., 1996; Reeves, Torres et Payne, 2000; Takase et al., 2000; Gorbacheva et al., 2001; Seliger et al., 2001). Un mutant tonB chez la souche UPEC CFT073 est atténué lors de l'infection de la vessie et des reins. TonB semble donc être nécessaire in vivo afin de permettre l'import des sidérophores qui sont nécessaires pour la colonisation et la multiplication des UPEC dans le tractus urinaire. Torres et al. ont voulu déterminer la contribution relative de chacun des systèmes de chélation du fer chez la souche UPEC CFT073 en les mutant. Les mutants ne pouvant exprimer une entérobactine ou une aérobactine fonctionnelle étaient en mesure de continuer d'infecter la vessie et les reins lors d'ITU. Ces résultats suggèrent que la synthèse d'un seul système ou sidérophore est requise in vivo. Une mutation dans les deux systèmes réduisait l'infection des reins (Torres et al., 2001).

ChuA est un récepteur de la membrane externe qui agit en système de transport de l'hème (Negre et al., 2004). Ce récepteur est présent chez les souches des groupes phylogénétiques B2 et D et absent chez les souches A et B1 (Clermont, Bonacorsi et Bingen, 2000).

1.2.2.4 Les polysaccharides de la capsule

Il existe plus de 80 types de polysaccharides capsulaires (ou antigènes K) qui recouvrent la bactérie afin de protéger la détection de l'antigène O (section 1.1.3) par le système de défense de l'hôte. Ces polysaccharides sont des polymères linéaires de sous-unités d'hydrates de carbone répétitives qui peuvent inclure, dans certains cas, des acides aminés ou des lipides. Les souches encapsulées sont beaucoup moins susceptibles à la phagocytoses par des neutrophiles et à l'opsonisation par le complément que les souches non encapsulées. De plus, la capsule joue un rôle au niveau de la résistance au sérum (section 1.2.2.5). Les antigènes K les plus souvent retrouvés chez les souches UPEC causant des cystites et des pyélonéphrites sont: K1, K2, K3, K5, K12, K13, K20 et K51.

L'antigène K1 est le plus rencontré autant chez les souches urinaires et fécales d'*E. coli*. Il est associé aux souches UPEC causant des pyélonéphrites, des méningites, des bactériémies néonatales, mais très peu avec celles causant des cystites ou encore des bactériuries asymptomatiques (Johnson, 1991). *E. coli* a la capacité de produire quatre types de capsule (groupe 1 à 4). Chacun de ces groupes est associé à des groupes distincts de sérotypes. Les souches ExPEC produisent les capsules du groupe 2 qui sont beaucoup plus présentes, entre autres, chez les souches UPEC contrairement aux souches fécales (Russo *et al.*, 1996a; Whitfield et Roberts, 1999).

Une étude de Russo a démontré qu'un mutant K54 diminuait la persistance lors de l'infection (Russo, Liang et Cross, 1994). Une analyse de STM a permis de confirmer l'importance de la production de la capsule chez les souches UPEC lors d'ITU. Bahrani-Mougeot et al. ont isolé trois différents mutants atténués à cause d'une déficience dans la production de la capsule (Bahrani-Mougeot et al., 2002). Une autre analyse STM a également permis de cibler trois mutants atténués au niveau des gènes impliqués dans la biosynthèse de la capsule chez une souche APEC causant des septicémies chez le poulet (Li et al., 2005).

1.2.2.5 La résistance au sérum

Le système du complément possède une activité lytique qui permet de tuer les bactéries dans le sérum humain. Le système du complément est composé de protéines et de glycoprotéines qui vont former un pore à travers la membrane externe de la bactérie grâce à un complexe d'attaque membranaire (membrane attack complex/MAC). Ce pore va permettre au lysozyme (substance antimicrobienne et cytotoxique) d'avoir accès à la membrane de peptidoglycan afin de la digérer et de permettre au MAC de s'insérer dans la membrane interne de la bactérie. Une fois le MAC installé, il y aura diffusion des ions et des petites molécules, ce qui conduira à une lyse cellulaire (Johnson, 1991). Pour contrer ce mécanisme de défense de l'hôte, les souches UPEC dépendent de facteurs tels que les LPS, les protéines de la membrane externe et de l'habileté de former une capsule (section 1.2.2.4) (Donnenberg et Welch, 1996). Les chaînes latérales O des LPS (antigène

somatique O) permettent de protéger la cellule contre le complément en déplaçant son site d'activation à distance des endroits sensibles de la membrane. Donc, plus la quantité de LPS est grande, plus la résistance au sérum le sera également (Johnson, 1991). Lors d'une expérience utilisant le modèle murin d'infection ascendante du tractus urinaire, une mutation dans l'antigène O4 a diminué la virulence d'une souche ExPEC (Russo et al., 1996a). Les bactéries peuvent aussi échapper au complément en bloquant l'activation du complément par des polysaccharides acides ou encore en agissant sur le fonctionnement du MAC. Les souches possédant les plasmides ColV (pColV) sont caractérisées par une résistance accrue au sérum et sont souvent retrouvées chez les souches UPEC causant des pyélonéphrites (Johnson, 1991).

1.2.2.6 Le sérotype

Le sérotype a été présenté préalablement (section 1.1.3). Les souches UPEC, faisant également partie de la flore intestinale, peuvent être différenciées des autres souches ExPEC grâce à leur antigène O. Les sérogroupes les plus fréquemment associés aux ITU sont: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O50 et O75. Les femmes dont le vagin est colonisé par les sérogroupes O2, O4, O6 et O75 sont susceptibles de développer une ITU. Dans le cas des ITU fébriles chez les enfants et des bactériuries asymptomatiques, c'est le sérogroupe O16 qui les caractérise. Le sérogroupe O18 est représentatif des souches d'UPEC causant des bactériuries asymptomatiques chez les enfants et les sérogroupes O8, O14, O25 et O83 sont associés aux souches d'UPEC causant des cystites chez les jeunes filles (Johnson, 1991).

1.2.2.7 La formation de biofilms

Le concept du développement de biofilms par les bactéries vient de l'idée que celles-ci coopèrent afin de survivre, de croître, de persister et de se disperser lorsqu'elles se retrouvent sur des surfaces dans l'environnement (Kau, Hunstad et Hultgren, 2005). L'épithélium de la vessie est formé de cellules superficielles (conférant la perméabilité de la vessie) en forme de parapluie qui permettent aux bactéries de s'y « cacher ». Les UPEC

ont la capacité de former des communautés bactériennes intracellulaires (CBI) (IBC/intracellular bacterial communities), au niveau de ces cellules, qui rappellent le développement de biofilms. L'étude d'explants de vessies de souris infectées par vidéomicroscopie à fluorescence à différents intervalles de temps, a permis à l'équipe de Hultgren de découvrir que les CBI formées par les UPEC passaient par quatre stades de développement distincts. Dans la première phase de développement des CBI, les bactéries sont non mobiles, en forme de bâtonnet et croissent de façon rapide en colonies non serrées, faiblement organisées et libres dans le cytoplasme des cellules en forme de parapluie. Ces phénomènes ont été observés 1 à 3 heures suite à l'infection des cellules. La croissance rapide des UPEC augmenterait, à ce moment, la persistance et la dissémination de ces derniers. Dans la seconde phase de développement, les bactéries de la CBI croissent plus lentement (temps de doublement > que 1 heure) en une sorte de biofilm hautement organisé. À cette étape, les bactéries sont en forme de coques et elles occupent la presque totalité du cytoplasme des cellules. La formation des CBI a été observée 6 à 8 heures suite à l'infection. Des gonflements de la surface luminale de la vessie étaient visibles suite à la formation des CBI; ceux-ci ont été appelés « pods ». Lors de la troisième phase, soit 12 heures suite à l'infection, les bactéries reprennent une forme de bâtonnet et redeviennent mobiles. Elles se détachent de la communauté et, éventuellement, sortent de la cellule hôte par un phénomène appelé « fluxing » (Anderson et al., 2003; Anderson et al., 2004; Anderson, Martin et Hultgren, 2004; Justice et al., 2004). Le « fluxing » ressemble beaucoup au phénomène de détachement qui a lieu dans les biofilms retrouvés sur les surfaces abiotiques (Mulvey et al., 1998; Klumpp et al., 2001). Le « fluxing » serait responsable de la bactériurie et faciliterait la dispersion et la colonisation d'autres cellules de la vessie. Finalement, lors de la quatrième phase de développement, certaines bactéries deviennent filamentées à peu près 20 heures suite à l'infection. Cette sous-population de bactéries continuerait de croître sans pouvoir se séparer pour former des cellules-filles. Ce phénomène de filamentation apparaîtrait en réponse à la présence des récepteurs « toll-like » 4 (TLR4) du système de défense innée de l'hôte. L'épithélium de la vessie de l'hôte répondrait à une invasion par des UPEC à l'aide de ces récepteurs qui, à leur tour, induirait la migration des PMNs au site d'infection (section 1.2.3). Les UPEC auraient, par la suite, la capacité de retourner dans

la CBI, mais avec une cinétique plus lente. Ce sont les phénomènes de croissance intracellulaire et de filamentation qui permettraient aux UPEC d'échapper aux PMNs (Anderson et al., 2004; Justice et al., 2004).

1.2.2.8 Les gènes conservés

En général, les études conduites jusqu'à présent ont permis d'identifier des gènes codant pour des produits appartenant au métabolisme de base et pour des gènes de virulence. Toutefois, plusieurs études ce sont davanatage concentrées sur l'identification et l'évaluation des facteurs de virulence impliqués dans la pathogenèse microbienne. Quelques études ont toutefois permis de caractériser les protéines, et les gènes codants associés, qui sont impliquées au niveau du métabolisme de base des bactéries (Russo et al., 1996b). Cependant, très peu d'études ont tenté de comprendre leur impact sur la virulence des souches pathogènes.

La technique « in vivo expression technology » (IVET) (section 1.3.1) a été utilisée par Mahan et al. afin d'identifier les gènes induits in vivo (gènes ivi) dans la rate des souris suite à une infection par la bactérie Salmonella typhimurium. Parmi les gènes identifiés, ils ont ciblé l'opéron carAB qui code pour une enzyme (carbamoyl-phosphate synthétase) impliquée dans la biosynthèse de l'arginine et des pyrimidines. L'induction de ce gène semblait corréler avec la faible disponibilité des pyrimidines dans les tissus animaux (Fields et al., 1986; Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993). L'étude de l'effet de l'inactivation de certains gènes chez une souche UPEC (CP9) incubées dans de l'urine humaine in vitro a permis d'identifier deux gènes appartenant au métabolisme de base. Les gènes guaA et argC semblent être importants pour la croissance de la bactérie dans l'urine humaine. De plus, ces deux inactivations semblaient diminuer la virulence de la souche CP9 dans le modèle d'infection ascendante du tractus urinaire de la souris (Russo et al., 1996b). Une étude de Dozois et al. a démontré que certains gènes conservés étaient hautement induits lors de l'infection. Cette expérience reposait sur l'étude des gènes pathospécifiques exprimés lors de l'infection chez le poulet par une souche APEC. Plusieurs gènes impliqués au niveau du métabolisme de base, de la croissance cellulaire,

de la réponse au stress, de la régulation et de fonctions inconnues ont tout de même été identifiés, mais leurs rôles potentiels au niveau de la virulence restent à être déterminés (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). Dans une autre étude, il a été démontré que le catabolisme de la D-sérine par la déaminase de D-sérine semblait apporter un avantage au niveau de la croissance de la souche UPEC CFT073 dans le tractus urinaire (Roesch et al., 2003). Une étude, utilisant la technique de DFI et la souche UPEC CFT073, a permis d'observer une atténuation de la virulence lorsqu'il y avait une mutation au niveau du gène degS (protéase de la membrane interne) lors d'infections péritonéales et du tractus urinaire chez la souris (Redford, Roesch et Welch, 2003). Plusieurs gènes régulatoires peuvent affecter l'expression des gènes conservés et des gènes de virulence. Il a été démontré qu'une mutation au niveau du gène pst (système de transport du phosphate dont la mutation conduit à l'expression constitutive du régulon Pho) chez une souche APEC, réduisait la virulence de cette dernière dans le modèle d'infection du poulet (Lamarche et al., 2005). Le gène tonB (section 1.2.2.3.5) est un autre gène conservé qui a été étudié lors des infections du tractus urinaire (Torres et al., 2001).

1.2.3 Les facteurs de résistance de l'hôte

Utilisant les cellules épithéliales comme sa première ligne de défense, le corps humain (et celui des animaux aussi) s'est doté de plusieurs moyens de contrecarrer une tentative d'invasion par des bactéries pathogènes. Dans le cas des ITU, les défenses primaires (immunité innée) se situent au niveau du tractus urinaire (Mulvey et al., 2000). Pour commencer, les fluides vaginaux constituent la première barrière entre les UPEC et les cellules épithéliales. Le vagin est lubrifié grâce au fluide provenant du réseau vasculaire de la muqueuse cervicale et de la lamina propria 10. L'adhérence des UPEC est donc affectée par les glycoprotéines et les oligosaccharides (provenant de la muqueuse cervicale, du filtrat de plasma ou encore du détachement de composantes de la surface de l'épithélium) contenu dans ce fluide. (Schaeffer et al., 2001; Saemann et al., 2005). Le tractus urinaire est considéré comme un environnement stérile puisque le flot continuel d'urine et le phénomène de miction permettent de rincer ce dernier, de façon régulière,

¹⁰ Tissu conjonctif sous la fine membrane qui recouvre la membrane muqueuse (site internet #5).

des bactéries qui seraient faiblement ou pas attachées à sa paroi (Mulvey et al., 2000; Bahrani-Mougeot et al., 2002). De plus, le faible pH et la faible et/ou forte osmolarité de l'urine, les sels, l'urée et les acides organiques présents dans l'urine sont des facteurs qui tendent à inhiber la croissance et la survie bactérienne. Dans le cas d'une forte osmolarité, il y a inhibition de la croissance due à la grande quantité de molécules inhibitrices tandis que dans le cas d'une faible osmolarité, le manque de nutriments devient aussi un facteur inhibiteur (Agace, Connell et Svanborg, 1996; Mulvey et al., 2000). L'urine peut contenir des lactoferrines qui séquestrent le fer disponible et donc, par le fait même, le rendent peu disponible aux bactéries (Mulvey et al., 2000). Plusieurs facteurs solubles associés aux cellules épithéliales du tractus urinaire ont des propriétés anti-adhérentes puisqu'elles entrent en compétition avec les récepteurs cellulaires pour l'attachement des bactéries. Ces facteurs (analogues des récepteurs d'adhésines) sont les glycoprotéines Tamm-Horsfall (sécrétées avec l'urine), les sucres de faible poids moléculaire, les immunoglobulines A (IgA) sécrétoires et des uromucoïdes (Agace, Connell et Svanborg, 1996; Mulvey et al., 2000).

La glycoprotéine Tamm-Horsfall (THP) est la protéine la plus abondamment retrouvée dans l'urine (Bates et al., 2004; Saemann et al., 2005). La THP possède une activité antimicrobienne directe en plus d'une activité immunomodulatoire (Saemann et al., 2005). Cette protéine, conservée au cours de l'évolution, est exclusivement synthétisée dans les reins au niveau de l'anse de Henlé et est exprimée à la surface luminale des cellules épithéliales des tubules rénaux. Elle est composée principalement d'oligosaccharides et de mannose (Bates et al., 2004; Saemann et al., 2005). Kumar et ses collaborateurs ont démontré que les souris THP-/- était plus susceptible aux infections urinaires. En effet, les souris THP-/-, lorsque inoculées par des isolats d'UPEC exprimant les fimbriae de type 1, présentaient une colonisation plus importante de la vessie et une durée plus longue de bactériurie que les souris THP+/+. Aucune différence n'était observée lorsque les souris THP-/- étaient inoculées par des isolats exprimant les fimbriae P (comparativement aux souris THP+/+). Ces résultats s'expliqueraient par la présence du mannose chez la protéine THP qui deviendraient les récepteurs des fimbriae de type 1. Les bactéries se lieraient aux THP, plutôt qu'aux récepteurs cellulaires habituels, chez les

souris THP^{+/+}, et elles seraient ensuite lessivées. Cette étude a donc permis d'apporter de nouvelles preuves quant au rôle de la THP dans la résistance aux UPEC (Bates *et al.*, 2004).

Les cellules épithéliales et hématopoïétiques du tractus urinaires expriment des récepteurs « toll-like » (TLRs) qui permettent de détecter les motifs microbiens ou les patrons moléculaires associés aux pathogènes (PAMPs/pathogen-associated molecular patterns), tels que le LPS, le peptidoglycan et la flagelline, afin d'induire l'activation des leucocytes et d'autres cellules stromales. Le TLR4 est le récepteur principal du LPS tout en étant aussi activé par les acides hyaluroniques, les sulfates d'héparine et les fibrinogènes. La stimulation du TLR4 active une cascade intracellulaire impliquant des protéines adaptatrices (MyD88, TIRAP et IRAK-4), des protéines kinases (p38 et ERK1/2) et le facteur de transcription NF-kB (Bower, Eto et Mulvey, 2005; Saemann et al., 2005). Cette activation induit une réponse pro-inflammatoire aiguë (Bower, Eto et Mulvey, 2005). Les TLR4 et TLR11 constituent les deux types de récepteurs qui sont importants au niveau des ITU (Bower, Eto et Mulvey, 2005). Les souris déficientes en TLR4 sont plus susceptibles aux infections de la vessie et des reins à cause de leur incapacité d'induire une réponse inflammatoire complète lors de la phase aiguë de l'infection. Les cytokines ne sont que faiblement exprimées et les PMNs n'infiltrent plus l'épithélium de la vessie (Hagberg et al., 1984; Mulvey et al., 2000; Schilling et al., 2001; Schilling et al., 2003; Zhang et al., 2004). Il a été démontré que le TLR11 défendait les souris contre les infections des reins par les UPEC. Des souris TLR11-/- présentaient une forte inflammation suite à une infection par des UPEC. Toutefois, le TLR11 ne joueraient pas un aussi important rôle chez l'humain à cause des multiples codons-stop retrouvés dans la séquence du gène TLR11 humain qui le rendrait non fonctionnel (Reiling et al., 2002; Picard et al., 2003; Bower, Eto et Mulvey, 2005).

Dans plusieurs cas, les bactéries arrivent à surpasser ces défenses primaires. À ce moment-là, plusieurs autres mécanismes de défense sont utilisés afin de lutter contre l'ennemi. Un de ces mécanismes est l'exfoliation cellulaire (immunité innée). Ce phénomène survient surtout en réponse à une infection par une souche UPEC exprimant

des fimbriae de type 1. L'exfoliation cellulaire est un mécanisme très similaire à celui de l'apoptose puisqu'il consiste en la fragmentation de l'ADN des cellules infectées et en l'activation d'enzymes protéolytiques que l'on nomme caspases. Les caspases, protéases de cystéines, sont des composantes centrales lors de l'initiation et l'exécution de la cascade apoptotique. Les cellules en forme de parapluie de l'épithélium de la vessie sont renouvelées qu'une fois tous les quelques mois chez l'hôte en santé tandis que suite à une infection par des UPEC, les cascades de prolifération et de différentiation sont rapidement enclenchées. Il semblerait que ce ne soit pas uniquement l'attachement des fimbriae de type 1 qui induise l'exfoliation cellulaire, mais plutôt l'adhérence impliquant l'adhésine FimH qui permettrait de faire un lien entre le LPS de la bactérie et les cellules hôtes. En fait, plusieurs facteurs, en plus du LPS, pourraient jouer un rôle dans l'activation de l'exfoliation cellulaire. De plus, le bagage génétique de l'hôte pourrait aussi affecter le taux et le degré d'exfoliation (Mulvey et al., 1998; Mulvey et al., 2000; Kau, Hunstad et Hultgren, 2005).

L'influx de neutrophiles et de cytokines au site d'infection (immunité innée) constitue un autre mécanisme de défense de l'hôte. Les neutrophiles (ou cellules PMNs) sont des phagocytes inflammatoires qui permettent de tuer les bactéries pathogènes grâce à la génération d'intermédiaires d'oxygène réactifs ou encore, par la libération de peptides anti-microbiens. Les cytokines et les chimiokines sont, quant à elles, des molécules solubles produites par un certain nombre de type cellulaire de l'hôte en réponse à une variété de molécules stimulatrices qui régulent la réponse inflammatoire. Un exemple de molécule stimulatrice est le LPS. Il semblerait que le recrutement de ce type de molécule soit un facteur critique à l'évacuation des UPEC de la vessie et des reins. De plus, leur présence dans l'urine suggère un rôle potentiel lors d'ITU et devient alors une caractéristique recherchée lors du diagnostic. Dans le cas des neutrophiles, afin d'induire la migration de ces dernières dans l'épithélium du tractus urinaire, il faut qu'il y ait une interaction entre leurs récepteurs CD11b/CD18 (Mac-1) et la molécule d'adhésion ICAM-1 qui se retrouve sur les cellules épithéliales de la vessie. C'est l'infection par des UPEC qui induirait l'expression des molécules ICAM-1 par les cellules épithéliales. Chez les patients atteints de cystites et de pyélonéphrites, on retrouve principalement la cytokine interleukine 6 (IL-6) et la chimiokine interleukine 8 (IL-8) dans l'urine. Une des sources majeures d'IL-6 et d'IL-8, suite à une infection par des UPEC, sont les cellules épithéliales de la vessie et des reins. L'IL-6 est une cytokine qui permet d'amplifier le signal de recrutement des neutrophiles tandis que l'IL-8 serait une molécule chimiotactique potentielle de neutrophiles (Mulvey et al., 2000; Saemann et al., 2005). Il a été démontré que les souches UPEC exprimant des fimbriae P et de type 1 induisaient la migration de beaucoup plus de cytokines au site d'infection que les souches ne les exprimant pas (Hedges, Svensson et Svanborg, 1992; Mulvey et al., 2000). Les fimbriae P induisent une voie de signalisation de céramide et de sérine/thréonine kinase-dépendante (et indépendante du LPS) qui active la production de cytokines par les cellules épithéliales des reins. Les fimbriae de type 1 activent, de façon indirecte, la production d'IL-6 par les cellules épithéliales de la vessie grâce à l'internalisation bactérienne. Ce phénomène d'internalisation augmente la réponse épithéliale aux LPS (Mulvey et al., 2000; Schilling et al., 2001).

Les cellules épithéliales du tractus urinaire peuvent aussi produire des facteurs antimicrobiens tels que l'oxyde nitrique et des défensines. Le contrôle des ITU par le système immunitaire s'effectue aussi par l'activation des mastocytes et des macrophages (Mulvey, 2002). De plus, la chélation du fer par les protéines de la cellule hôte constitue un autre moyen de rendre la bactérie plus vulnérable et de permettre ainsi son élimination (voir section 1.2.2.4). L'hôte va réduire la quantité de fer disponible en diminuant le taux d'absorption intestinal du fer, en synthétisant plus de protéines chélatrices de fer et en entreposant, de façon intracellulaire, le fer retrouvé dans le plasma (Johnson, 1991).

Les antigènes déterminant un type de groupe sanguin constituent une partie importante des cellules sanguines et uroépithéliales et sont caractérisés par des structures d'hydrates de carbones qui sont liées à la membrane lipidique des protéines. L'absence de récepteurs pour les fimbriae P constitue un avantage pour un individu puisqu'il ne possède pas la structure nécessaire à l'attachement des UPEC. Par exemple, les individus présentant le phénotype « p » dans le système de groupe sanguin P, synthétise une forme non

fonctionnelle du glycolipide Galα1-4Galβ sur les cellules uroépithéliales et les érythrocytes (Agace, Connell et Svanborg, 1996; Warren, 1996; Schaeffer et al., 2001).

Lorsque l'immunité innée n'a pas permis d'éliminer complètement l'infection, l'immunité spécifique entre en cours. L'immunité spécifique implique une réponse mucosale et systémique des anticorps et une réponse de l'immunité cellulaire. La muqueuse du tractus urinaire contient quelques cellules T CD8⁺ et T CD4⁺. Lors de cystites, c'est surtout les cellules T CD4+ que l'on retrouve au niveau de l'épithélium du tractus urinaire et de la sous-muqueuse. Les anticorps retrouvés dans l'urine sont les IgA, IgG et quelques rares fois, les IgM. La réponse immunitaire par les anticorps peut prendre jusqu'à 10 jours avant de s'installer et elle est beaucoup plus importante dans les cas de pyélonéphrites aiguës que dans les cas de cystites et de bactériuries asymptomatiques. Les antigènes O et K sont souvent la cible de ces anticorps. Dans les cas de pyélonéphrites aiguës, de cystites aiguës et de bactériuries asymptomatiques chez les jeunes filles, les IgG vont cibler le lipide A du LPS (Agace, Connell et Svanborg, 1996).

Malgré tous ces mécanismes de défense mis en place par l'hôte, les ITU peuvent devenir des infections persistantes et même récurrentes. La persistance des UPEC est reliée, en grande partie, à la capacité des souches exprimant les fimbriae de type 1 d'entrer dans les cellules épithéliales de la vessie, et ainsi, d'être protégées des traitements par des antibiotiques tel que la TMP-SMX. En temps normal, le phénomène d'exfoliation devrait régler ce problème, ce qui n'est cependant pas toujours le cas.

1.2.4 Les modèles d'infection

1.2.4.1 Les modèles in vitro et cellulaires

La recherche du mécanisme d'ascension du tractus urinaire par les uropathogènes a nécessité le développement de modèles in vitro pour étudier l'interaction des pathogènes et des cellules concernées. Les modèles utilisés ont permis, entre autres, d'étudier les variations de phase fimbriaire (mécanisme on/off chez *E. coli*), le tropisme des adhésines

et les mécanismes d'invasion des uropathogènes. Les études in vitro impliquent l'utilisation de cellules provenant de tissus ou d'organes d'intérêt au cours d'une ITU (cellules épithéliales de vessies et de reins, érythrocytes, etc.) (Caprioli et al., 1983; Fiorentini et al., 1997; Boquet, 2000; Guyer et al., 2000; Landraud et al., 2000; Selvarangan et al., 2000; Bauer et al., 2002; Guyer et al., 2002; Emody, Kerenyi et Nagy, 2003; Heimer et al., 2004; Landraud et al., 2004). Plusieurs manipulations sont possibles lors de l'étude de cellules en culture. Par exemple, pour l'étude de la variation de phase des fimbriae, l'immunofluorescence est utilisée. Cette technique implique l'utilisation d'IgG couplés à des anticorps qui ciblent des structures fimbriaires spécifiques (antifimbriae type 1, anti-fimbriae P, etc.). Le complexe formé est ensuite visualisé par microscopie. Afin d'étudier la cinétique de la variation fimbriaire, c'est souvent la technique du fractionnement qui est utilisée. Cette technique consiste à l'isolement de sous-populations de cellules bactériennes exprimant des fimbriae par absorption à des érythrocytes et à des cellules de levures. L'étude de la structure des colonies et de l'expression des fimbriae utilise une modification de la technique d'immunofluorescence. Les anticorps sont encore utilisés, mais contre des colonies qui poussent sur une membrane de cellulose. Afin d'étudier le tropisme cellulaire des différents types de fimbriae, des coupes de section de tissus rénaux par exemple, sont utilisés et la spécificité de l'adhésion aux différentes structures rénales est observée (Nowicki, 1996).

1.2.4.2 Les modèles in vivo

Lors de l'étude des pathogènes, des modèles animaux sont souvent utilisés afin de reproduire, le plus possible, l'infection telle qu'elle se passe en réalité chez l'homme; ce que les études in vitro ne peuvent parvenir à reproduire. Les modèles in vivo permettent, entre autres, l'étude de l'interaction pathogènes-hôte, de l'établissement de l'infection et de l'attachement aux différentes surfaces de l'hôte. Plusieurs facteurs sont à considérer lors du choix d'un modèle animal: type d'animal, le sexe, la taille, la stérilité, la lignée (inbred ou outbred), la route d'infection, le dosage, le taux d'infection, la fréquence de l'infection, etc. Afin d'établir le processus de l'infection urinaire chez l'homme, plusieurs animaux (chiens, souris, singes, cochons, lapins et rats) ont été utilisés à cette fin. Les

chiens posaient un problème au niveau de la reproduction de l'ITU par la route ascendante. Il était nécessaire d'effectuer une ligature de l'uretère (vessie partiellement obstruée) et d'injecter l'inoculum à proximité de cette ligature. Cette obstruction n'a permis que l'étude de cystites. Les rats, quant à eux, étaient choisis à cause des coûts peu élevés pour se les procurer et pour les loger. De plus, les rats développent des pyélonéphrites de façon spontanée. Ils ont beaucoup été utilisés pour l'étude de la vaccination, de la thérapie par antibiotique et des facteurs bactériens lors du développement d'une ITU. Quelques problèmes sont survenus lors de l'utilisation des rats: un phénomène de reflux de l'inoculum de la vessie vers les uretères et les reins avait lieu lors d'infection ascendante (Johnson et Russel, 1996).

Maintenant que l'avancement des connaissances sur les infections urinaires a permis de comprendre la route que les bactéries prenaient pour causer l'infection, quelques animaux ont été sélectionnés à cause de leur capacité de mimer l'infection urinaire chez l'humain. Il semblerait que les souris et les primates non-humains (comme les singes) constituent les meilleurs modèles animaux. En effet, leur tractus urinaire contiendrait des récepteurs digalactosides, ressemblant beaucoup à ceux retrouvés chez l'humain, qui serviraient justement de site d'attachement pour les fimbriae P exprimés par les souches UPEC (Roberts et al., 1994; Johnson et Russel, 1996). L'infection ascendante, la route la plus commune, peut avoir lieu chez ces animaux sans manipulations supplémentaires comme l'obstruction de la vessie (Hagberg et al., 1983). Toutefois, les souris constituent le meilleur choix de modèle à cause qu'elles ont déjà permis d'identifier une variété de facteurs de virulence chez des souches UPEC et des souches de Providencia stuartii et de Proteus mirabilis. De plus, elles sont beaucoup moins dispendieuses, demandent moins de commodités pour les entretenir et sont disponibles en grandes quantités chez plusieurs détaillants contrairement aux primates. Les primates non-humains ne devraient être utilisés que pour la confirmation de données étant donné le lien très rapproché qu'ils ont avec l'humain et leur coût élevé (Johnson et Russel, 1996; Warren, 1996).

La section précédente a permis d'effectuer un bref survol des caractéristiques importantes des souches UPEC et des mécanismes par lesquels l'hôte tentait de résister à ces

dernières. Dans la section qui suit, il sera plutôt question des différentes techniques disponibles pour l'analyse de l'expression génique lors de l'infection.

1.3 Analyse de l'expression génique

Un des buts de l'étude de la pathogenèse microbienne consiste à analyser l'expression génique afin d'en comprendre les mécanismes moléculaires qui permettent aux pathogènes de contrecarrer le système immunitaire et de causer des maladies. De façon plus large encore, il devient important de trouver de nouvelles cibles pour le développement de drogues antimicrobiennes.

L'identification des différents facteurs de virulence a toujours été dépendante et limitée par l'habileté de mimer les facteurs environnementaux de l'hôte en laboratoire. Pour ce faire, plusieurs techniques ont été créées afin de permettre l'étude de l'expression des gènes bactériens directement à l'intérieur de l'hôte. En effet, au lieu de reproduire les signaux environnementaux d'une condition donnée, c'est l'induction des gènes directement dans l'hôte qui est préconisée. Plusieurs produits de gènes, importants pour la pathogenèse de la bactérie, sont régulés de façon à répondre aux signaux environnementaux, donc ils sont exprimés à un temps approprié et à un endroit spécifique pendant l'infection (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993; Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a). De plus, la nature multifactorielle de la virulence indique aussi la possibilité de plusieurs routes alternatives disponibles pour passer de l'infection à la mortalité de l'hôte (Heithoff et al., 1997).

La sous-section qui suit va tenter de faire un bref survol des différentes approches disponibles permettant l'identification et l'évaluation de l'expression de gènes bactériens durant l'infection.

1.3.1 IVET

IVET (in vivo expression technology) a été décrite pour la première fois en 1993 par Mahan et al. Cette technique permet d'identifier les gènes dont l'expression est induite dans un environnement spécifique (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999). En d'autres termes, les gènes recherchés doivent être transcriptionellement actifs dans le modèle d'infection (in vivo) et être transcriptionellement inactifs hors du modèle d'infection (in vitro). IVET est basée sur une approche de sélection positive par l'identification de promoteurs de gènes qui sont actifs in vivo. Ces derniers sont en mesure de complémenter un auxotrophe atténué afin de lui permettre de redevenir virulente (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993; Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a; Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994b).

1.3.1.1 Description sommaire de la technique

Le chromosome de la souche bactérienne à l'étude est partiellement digéré afin de générer divers fragments d'ADN. Ces fragments sont clonés dans un vecteur. Ce vecteur origine d'un plasmide suicide qui contient un opéron contenant un gène biosynthétique (codant pour une protéine essentielle à la survie de la bactérie lors de l'infection) (sans promoteur), un gène rapporteur (sans promoteur) et un gène de résistance à un antibiotique (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993; Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a; Chiang, Mekalanos et Holden, 1999). La banque de fragments d'ADN de la souche fusionnés (en 5') au gène sans promoteur est transférée dans une souche bactérienne auxotrophe pour le gène biosynthétique et qui ne contient pas le gène de résistance à l'antibiotique. Une déficience au niveau du gène pir (codant pour la protéine Pi nécessaire à la réplication du plasmide) chez ce vecteur l'oblige à s'intégrer au chromosome. Ce dernier point permet d'avoir la fusion en une seule copie dans le chromosome afin d'éviter les problèmes engendrés par l'utilisation des plasmides (gènes se retrouvant en plusieurs copies) (Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a). De plus, l'intégration du plasmide se fait par recombinaison homologue (« single crossover » ou enjambement simple) afin de ne pas interrompre le gène sauvage sur le chromosome. (Chiang,

Mekalanos et Holden, 1999). Une fois l'intégration effectuée, le pool de bactéries contenant les différentes fusions sont introduites dans l'hôte à l'étude. C'est le promoteur cloné qui permet d'activer la fusion. Seules les bactéries contenant des fusions à des promoteurs transcriptionellement actifs pendant l'infection sont en mesure de surpasser l'auxotrophie, de survivre et de se répliquer à l'intérieur de l'hôte. L'organe d'intérêt est ensuite isolé, puis homogénéisé afin d'en récolter les cellules bactériennes.

(Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a).

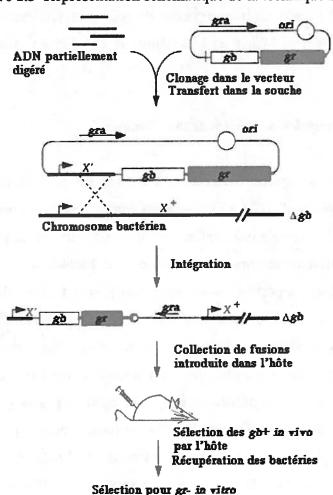


Figure 1.3 Représentation schématique de la technique IVET.

Légende: gra = gène de résistance à un antibiotique; gb = gène biosynthétique; gr = gène rapporteur; ori = origine de réplication. Tiré et modifié de Chiang et al. 1999.

Étant donné la configuration de la construction de départ, seules les bactéries dont le gène rapporteur est induit in vivo sont en mesure de croître sur un milieu minimal. Pour

identifier les gènes induits in vivo (gènes *ivi* pour « in vivo induced genes »), ce sont les bactéries dont le gène rapporteur est réprimé in vitro et induit in vivo qui sont recherchées (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993; Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a).

Il est à noter que selon l'organisme, le gène produisant l'auxotrophie, le gène de résistance à l'antibiotique et le gène rapporteur peuvent différer afin que la technique s'ajuste mieux à l'organisme à l'étude (Slauch, Mahan et Mekalanos, 1994a; Chiang, Mekalanos et Holden, 1999; Angelichio et Camilli, 2002).

1.3.1.2 Avantages et inconvénients

Un des avantages de cette technique est qu'elle permet l'utilisation de la sélection positive afin d'isoler des gènes *ivi* d'un pool de fusion au lieu de faire de la recherche individuelle de gènes. De plus, elle favorise l'identification de gènes hautement exprimés pendant l'infection puisque la sélection stringente subséquente permet de prévenir la survie des bactéries contenant des fusions avec des promoteurs faibles ou transitoires pendant l'infection (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993; Chiang, Mekalanos et Holden, 1999; Angelichio et Camilli, 2002).

D'un autre côté, il existe plusieurs désavantages, à l'utilisation de cette technique, qui découlent des avantages de cette dernière. Tout d'abord, cette technique tend à discriminer trop fortement les gènes exprimés in vitro. En effet, ils sont presque entièrement éliminés in vivo. Il n'existe pourtant pas de raisons pour qu'un gène d'importance in vivo ne le soit pas in vitro également. De plus, cette technique n'analyse pas les gènes réprimés pendant l'infection et ne quantifie pas les changements de niveau d'expression des gènes (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999) donc les gènes exprimés de façon transitoires ou exprimés très faiblement in vivo, deviennent difficiles, et voire même impossibles, à détecter puisqu'ils ne produisent pas la protéine essentielle (codée par le gène biosynthétique) pendant un laps de temps assez grand pour assurer la survie et la croissance bactérienne (Angelichio et Camilli, 2002). D'un point de vue beaucoup plus technique, les conditions de culture in vitro sont très importantes puisque tout dépendant

du milieu (riche ou minimal), les mêmes gènes ne seront pas exprimés, ce qui peut modifier les résultats lors de la comparaison avec les données in vivo. De plus, il faut que la souche bactérienne utilisée soit génétiquement manipulable afin de permettre la préparation de la librairie de fusions (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999; Angelichio et Camilli, 2002). Finalement, il faut garder en tête que tous les gènes *ivi* ne sont pas nécessairement essentiels lors de l'infection (Angelichio et Camilli, 2002).

1.3.2 STM

La technique de STM (signature-tagged mutagenesis) a été décrite en 1995 par David Holden et son équipe. Ils étudiaient la bactérie Salmonella typhimurium dans un modèle murin de fièvre typhoïde (Hensel et al., 1995; Shea, Santangelo et Feldman, 2000). La technique de STM consiste en l'utilisation de l'hybridation comparative pour isoler les mutants incapables de survivre dans des conditions environnementales spécifiques. Elle repose sur la capacité du pathogène en question de se répliquer in vivo dans une population mixte et permet, ainsi, la détection et l'identification de gènes nécessaires à la survie in vivo (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999).

1.3.2.1 Description sommaire de la technique

STM utilise une collection de transposons où chacun est modifié par l'incorporation d'une séquence différente d'ADN (étiquette ou « tag ») (figure 1.4). Le « tag » constitue un petit segment d'ADN qui contient 40 paires de base (pb) de région centrale variable flanqué par des « bras » de 20 pb invariables qui facilitent la co-amplification et le marquage de la portion centrale par PCR. Les bactéries sont mutées par transposition et sont placées individuellement dans une plaque à micropuits. Cette collection de mutants sert pour l'infection. Ces transposons étiquetés et utilisés pour la mutagenèse permettent ensuite de distinguer chaque mutant les uns des autres à cause du caractère unique de chaque « tag ». Pour ce faire, des PCR (réaction de polymérase en chaîne) sont effectués pour la préparation de sondes marquées qui représentent les « tags » présents dans la

présélection (« input » ou avant infection) et dans la post-sélection (« output » ou après infection) de la banque de mutants. Ces deux groupes de sondes peuvent être comparés par des techniques d'hybridation comme le « colony blot » ou encore le « dot blot » sur des filtres ayant les séquences des différents « tags » provenant de chacun des mutants initialement isolés.

Tag d'ADN Bras invariable Bras invariable Région variable P3 P2 [NK]20 Km Transposon Plaque à micropuits contenant la collection de mutants 000000 Collection de mutants 000000 Réplicat sur la membrane 1 et 2 Injection dans le modèle d'infection Identification des Récupération des mutants non-virulents bactéries du modèle 0 output 0 0

Figure 1.4 Représentation schématique de la technique STM.

Tiré et modifié de Handfield et Lévesque 1999.

On peut donc identifier les mutants qui sont incapables de survivre au processus de sélection parce que les « tags » des mutants seront absents dans la post-sélection. Ces derniers peuvent être récupérés dans la plaque à micropuits de présélection et la séquence nucléotidique flanquant le transposon peut être déterminée. On dira de ceux-ci qu'ils sont des mutants atténués ou encore avirulents, donc qui diminue la virulence (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999; Shea, Santangelo et Feldman, 2000).

1.3.2.2 Avantages et inconvénients

Tout comme la technique de IVET, STM permet l'utilisation d'une collection de mutants au lieu d'un dépistage individuel de ceux-ci, donc ce qui permet l'utilisation d'un faible nombre d'hôte pour l'infection. Toutefois, cette technique est beaucoup plus directe que IVET puisqu'elle permet d'isoler des gènes requis pour la survie à l'intérieur de l'hôte tandis que les gènes *ivi* trouvés par IVET doivent être mutés suite à l'expérience afin de démontrer leur implication dans la virulence lors de l'infection (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999).

STM utilise la sélection négative au lieu de la sélection positive. La sélection positive permet d'identifier des mutations conférant un gain de fonction tandis que la sélection négative, quant à elle, permet d'identifier des gènes mutés qui démontrent une perte de fonction (Shea, Santangelo et Feldman, 2000). La mutagenèse par transposon n'est pas complètement aléatoire et peut donc favoriser des mutations en certains endroits du chromosome par rapport à d'autres. STM peut aussi empêcher l'identification de mutations causant des diminutions modérées dans la survie malgré le fait que ces mutations peuvent être critiques pour la virulence de la bactérie lors de l'infection (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999).

Il existe des facteurs pouvant restreindre la complexité de la collection de mutants utilisée comme inoculum de départ. Premièrement, plus la complexité augmente, plus les probabilités sont grandes que des mutants virulents ne soient pas présents en quantité suffisante dans les organes de l'animal infecté afin de produire assez de sondes marquées

pour l'analyse par hybridation. Ce qui engendrerait l'identification de mutants virulents. De plus, lors de l'analyse par hybridation, la quantité de sonde marquée pour chaque transposon sera inversement proportionnelle à la complexité de la collection étiquetée. En d'autres termes, ces facteurs impliquent que la grosseur de la collection de mutants ne doit pas dépasser un certain seuil maximal. Par exemple, lors de la première description de la technique STM en 1995, il a été noté qu'une banque de 96 mutants donnaient de bons signaux d'hybridation tandis que lorsque l'on augmentait la banque à 192 mutants, l'intensité des signaux était plus faible et le patron obtenu était moins reproductible (Hensel et al., 1995).

1.3.3 **DFI**

La technique de DFI (differential fluorescence induction/induction différentielle de la fluorescence) a été développée chez Salmonella typhimurium en 1996 par Valdivia et Falkow afin d'étudier l'expression différentielle des gènes bactériens chez les macrophages murins. Elle consiste en l'utilisation d'une protéine verte fluorescente (gfp pour green fluorescent protein), provenant de la méduse Aquorea victorea, qui émet naturellement une fluorescence verte lorsqu'elle est excitée par la lumière bleue (Cubitt et al., 1995; Valdivia et Falkow, 1996; Valdivia et al., 1996). Cette protéine est utilisée comme rapporteur de l'activité du promoteur et la technique dépend du FACS (fluorescence-activated cell sorting) pour la sélection des fusions de gènes actifs (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999).

1.3.3.1 Description sommaire de la technique

Des fragments aléatoires d'ADN chromosomique de la souche étudiée sont clonés en amont d'un gène gfp sans promoteur (figure 1.5). Cette librairie de fusions, se retrouvant sur des plasmides qui ne peuvent se recombiner au chromosome, est introduite dans la souche étudiée afin de produire une collection de clones. Les clones sont ensuite utilisés afin d'infecter l'hôte animal ou encore la culture cellulaire (comme des macrophages par

exemple). La technique du FACS est ensuite utilisée afin de détecter et d'isoler les macrophages ou les cellules contenant des clones avec des fusions gfp actives. Les cellules isolées peuvent être lysées afin de les faire croître dans une culture in vitro et de cibler celles qui auront une faible fluorescence au FACS. Les bactéries recherchées sont celles qui ont une activité dépendante de la cellule hôte, donc contenant des fusions gfp actives in vivo et inactives in vitro (Valdivia et Falkow, 1997; Chiang, Mekalanos et Holden, 1999).

Infection des cellules Triage Pool de bactéries contenant les fusions gfp Bactéries Fusions actives in vivo récupérées sur milieu Fusions inactives in vitro Triage Retest individuel Bactéries contenant des fusions potentiellement induites ia vivo

Figure 1.5 Représentation schématique de la technique DFI.

Tiré et modifié de Chiang et al., 1999.

1.3.3.2 Avantages et inconvénients

Les fusions gfp ne sont pas nécessaires à la survie pendant l'infection et les souches contenant ces fusions peuvent être classifiées efficacement par l'activité de la gfp. De plus, les fusions activent de gfp peuvent être détectés par l'analyse par FACS de tissus homogénéisés provenant d'animaux infectés, donc n'est pas restreintes aux modèles de virulence en cultures cellulaires (Chiang, Mekalanos et Holden, 1999). Sans oublier que l'utilisation du FACS pour le dépistage et les étapes de sélection permet d'éliminer les biais inhérents aux manipulations de l'expérimentateur (Valdivia et Falkow, 1997; Handfield et Levesque, 1999) et le niveau d'expression absolue du marqueur sélectionné. Les cellules contenant des fusions gfp exprimant une faible fluorescence seront isolées aussi bien que celles présentant une très forte fluorescence (Valdivia et al., 1996).

Par contre, tout comme la technique IVET, cette technique permet l'identification de gènes ivi, mais elle ne donne pas de réponse quant au rôle de ces gènes dans la virulence contrairement à la technique de STM qui conduit à un dépistage plus direct. De plus, elle est basée sur une fusion transcriptionnelle, ce qui ne permet pas la détection de gènes qui sont régulés de façon post-transcriptionnels in vivo (Hautefort et Hinton, 2000). Des études ont récemment mis en lumière l'effet néfaste de l'utilisation de la gfp chez les bactéries. Une étude de Rang sur quatre espèces bactériennes a démontré que l'expression de la gfp chez ces dernières avait un effet sur leur temps de dédoublement. L'observation de cellules allongées indiquait que la production de gfp semblait faire obstacle à la division cellulaire des bactéries. La gfp serait donc coûteuse pour la bactérie et l'obtention de promoteurs très actifs à partir d'une banque de promoteurs génomiques serait problématique. Afin d'utiliser la gfp avec succès, il faudrait utiliser des bactéries cultivées pendant un nombre de génération minimal et restreindre l'expression de la gfp en utilisant un vecteur de faire nombre de copies pour cloner la banque (Rang et al., 2003). Une autre étude a démontré que l'expression de la gfp par S. enterica diminuait l'invasion et la survie de cette dernière dans des cellules épithéliales et des macrophages. De plus, la colonisation des souris était réduite suite à l'expression de protéines fluorescentes telles que la gfp par S. enterica (Knodler et al., 2005).

1.3.4 SCOTS

SCOTS (Selective Capture Of Transcribed Sequences) est une méthode de capture sélective des séquences transcrites. SCOTS a été décrite pour la première fois en 1999 par Graham et Clark-Curtiss afin de permettre l'étude de l'expression de gènes microbiens durant l'infection de macrophages.

1.3.4.1 Description sommaire de la technique

SCOTS est une technique (figure 1.6) qui combine: l'isolement et la purification de l'acide ribonucléique (ARN) d'organes d'un animal infecté par une souche bactérienne; la synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) à partir de cet ARN; l'hybridation de ce dernier à de l'ADN génomique (ADNg) biotinylé dont les sites ribosomaux auront été préalablement bloqués (ADNr) et l'amplification par PCR (Daigle, Hou et Clark-Curtiss, 2002). Pour plus de détails sur ces manipulations, voir la section 2.4 du matériel et méthodes.

Tissus infectés

Hybridation

ADNc avec séquence terminale définie

ADN bactérien biotinylé et bloqué avec de l'ADNr

Séparation magnétique

Élution

PCR

Figure 1.6 Représentation schématique de la technique de SCOTS.

Tiré et modifié de Graham et al. 1999 et de Daigle et al. 2002.

1.3.4.1.1 Les applications de SCOTS

Jusqu'à présent, une dizaine d'articles présentant des résultats portants sur la pathogenèse microbienne et la réponse de la bactérie lors de l'interaction avec l'hôte grâce à la technique SCOTS ont été publiées. Elles ont donc permis de démontrer directement l'utilité et l'intérêt d'une technique telle que SCOTS.

SCOTS a été utilisée à plusieurs reprises pour l'étude de l'expression des gènes dans des cultures cellulaires telles que les macrophages. Lors de la toute première description de la technique de SCOTS, Graham et Clark-Curtiss (1999) ont tenté d'identifier les gènes d'importance dans la réponse de Mycobacterium tuberculosis à la phagocytose dans des cultures de macrophages humains (Graham et Clark-Curtiss, 1999). Une étude de Morrow et al. (1999) a permis d'identifier des gènes transcrits, uniques à S. typhimurium, suite à la phagocytose par des macrophages. Un nouveau régulateur transcriptionnel putatif et un nouvel opéron fimbriaire seraient absents de la souche parente Salmonella typhi (Morrow, Graham et Curtiss, 1999). En 2001, Daigle et al. ont identifié des gènes importants pour la survie de S. typhi dans les macrophages grâce à SCOTS. Ils ont identifié des gènes non exprimés in vitro, mais exprimés lors de la phase initiale de l'interaction entre S. typhi et les macrophages (Daigle, Graham et Curtiss, 2001). Une étude portant sur l'expression des gènes lors de la croissance de Mycobacterium avium dans des macrophages humains a permis d'identifier des gènes exprimés à 48 heures, après 110 heures et tout au long de l'infection suite à l'infection des macrophages (Hou, Graham et Clark-Curtiss, 2002). SCOTS a permis, d'une part, la capture de transcrits spécifiques à la souche S. typhi, absents du génome de S. typhimurium lors de l'infection de macrophages humains (Faucher, Curtiss et Daigle, 2005) et d'autre part, d'obtenir le transcriptome de Salmonella enterica serovar Typhi lors d'infections similaires (Faucher et al., 2006).

SCOTS a également été utilisée pour identifier des gènes exprimés suite à des infections dans des modèles animaux et humains. La caractérisation de l'expression des gènes de *Helicobacter pylori* lors de la colonisation naturelle de l'estomac humain (muqueuse gastrique) par rapport à une culture en laboratoire a permis d'identifier un groupe de

gènes spécifiques à cette bactérie, en plus de gènes putatifs qui seraient potentiellement exprimés lors de la réponse aux signaux environnementaux et de l'hôte (Graham et al., 2002). Dozois et al. (2003) ont isolé, de façon préférentielle, les gènes pathospécifiques (ne se retrouvant pas chez E. coli K-12) d'une souche APEC qui seraient exprimés dans des poulets infectés (Dozois, Daigle et Curtiss, 2003). Baltes et al. (2004) ont utilisé SCOTS afin d'identifier les gènes exprimés par Actinobacillus pleuropneumoniae dans des tissus pulmonaires porcins nécrosés à la fin de la phase aiguë d'infection des porcs (7 jours post-infection) (Baltes et Gerlach, 2004).

SCOTS a permis l'étude plus particulière de systèmes tels que ceux à deux composantes ou encore de gènes impliqués dans une réponse dans une condition particulière. La technique SCOTS a été utilisée afin de déterminer l'expression d'un système à deux composantes, trcRS, chez M. tuberculosis dans un bouillon de culture et dans des macrophages. Les résultats obtenus ont permis de démontrer qu'il y avait une expression de ces deux gènes très tôt après l'infection des macrophages, mais que cette expression cessait suite à une longue période dans les macrophages (Haydel et al., 2002). Une étude de Haydel et al. (2004) portait sur différents systèmes de régulation à deux composantes retrouvés chez M. tuberculosis. Plus précisément, ils ont travaillé avec des paires de systèmes de régulation à deux composantes, des gènes régulateurs de réponse orphelins et des gènes histidine kinase orphelins. L'objectif de cette étude consistait à analyser le profil d'expression de ces systèmes dans des macrophages humains selon différents temps et de les classifier selon qu'ils étaient constitutivement exprimés, différentiellement exprimés ou encore, avec une expression non détectable (Haydel et Clark-Curtiss, 2004). Afin de déterminer les gènes ayant un rôle dans l'adaptation au froid, Liu et al. (2002) ont étudié les gènes différentiellement exprimés lors de la croissance de Listeria monocytogenes à 10°C par rapport à la croissance à 37°C. Cette expérience avait pour but de comprendre les mécanismes permettant à cette bactérie de croître dans les aliments réfrigérés. Les résultats obtenus ont indiqué une acclimatation de L. monocytogenes à 10°C (Liu et al., 2002).

1.3.4.2 Avantages et inconvénients

La technique de SCOTS présente de nombreux avantages. Un des avantages de SCOTS est de faire une sélection des gènes exprimés in vivo de souches sauvages sans modifications génétiques. De plus, SCOTS regroupe une combinaison de techniques déjà connues et simples à effectuer. Elle permet aussi de travailler avec de l'ADN au lieu de l'ARN, ce qui réduit les problèmes de stabilité associés à l'ARN. Elle permet l'élimination de l'ARN eucaryote et ribosomal bactérien qui constituent la grande majorité des transcrits extraits des organes infectés (Neidhardt et Umbarger, 1996). Un autre avantage de cette technique réside dans le fait qu'il n'est pas nécessaire d'avoir beaucoup de matériel de départ (donc un faible nombre de bactéries), ce qui démontre la grande sensibilité de cette technique. Un modèle naturel d'infection peut alors être utilisé. Ce dernier point apporte un net avantage par rapport aux approches conventionnelles d'identification de gènes exprimés in vivo (Daigle, Hou et Clark-Curtiss, 2002). La technique de SCOTS permet aussi de cibler une grande diversité de transcrits (Hou, Graham et Clark-Curtiss, 2002). Finalement, malgré l'amplification par PCR, cette technique reste tout de même semi-quantitative. Ce dernier point pourrait sembler un inconvénient dépendamment de l'expérience que l'on veut effectuer.

1.3.5 Biopuces à ADN

Le principe des biopuces à ADN implique l'hybridation spécifique de molécules d'acides nucléiques ou de sondes (couplés à des marqueurs) en solution à leur séquence complémentaire d'ADN fixée (cible) sur une matrice solide et immobile. Un système de détection est ensuite utilisé afin de quantifier le signal d'hybridation (Cummings et Relman, 2000). Une expérience de biopuces à ADN consiste donc en quatre grandes étapes: la fabrication des puces, la préparation des sondes, l'hybridation et l'analyse des données. Les types de biopuces les plus couramment utilisés sont discutés dans la section qui suit.

1.3.5.1 Description sommaire de la technique

1.3.5.1.1 Types de matrice

Traditionnellement, une membrane poreuse de nylon était utilisée afin d'y déposer des fragments d'ADN (ADNc, ADNg, produits de PCR ou librairies de plasmides). Les sondes à hybrider étaient donc marquées par radioactivité. Ce type de matrice n'est plus autant utilisé de nos jours. Actuellement, les lames de verre (lames de microscope) sont davantage utilisées. Dans ce cas, c'est plutôt la fluorescence qui est utilisée lors de la détection (figure 1.7a) (Lockhart et Winzeler, 2000). Les fragments d'ADN (cadres de lecture ouverts complet ou oligonucléotides) sont physiquement attachés à des endroits très précis sur une matrice solide. Cet attachement implique la déposition des biopuces par robotisation à l'aide de fins capillaires (Cummings et Relman, 2000) sur des lames préalablement recouvertes soit d'aldéhydes, soit d'aminosilane ou encore de poly-lysine (Watson et al., 1998; Ye et al., 2001).

L'avancement de la technologie autant pour la synthèse et la déposition des cibles a permis de mettre beaucoup plus d'éléments sur une même matrice. Les biopuces à haute densité d'oligonucléotides (figure 1.7b) (comme les technologies d'Affymetrix ou de NimbleGen Systems) ont donc fait leur apparition. Étant beaucoup plus petites, elles permettent de retrouver jusqu'à 10 000 différents oligonucléotides par centimètre carré de matrice (Lockhart et Winzeler, 2000). Cette technologie permet la synthèse in situ, par photolithographie, d'oligonucléotides simple brin (base par base). Les matrices contiennent ces oligonucléotides (habituellement de 20-25 nucléotides) qui constituent plusieurs régions d'un même gène, en plus d'avoir dans chaque cas un oligonucléotide « mismatch » (modification de la base centrale) correspondant qui sert comme contrôle interne. Elles possèdent également des gènes standards dont les quantités sont connues (Gerhold, Rushmore et Caskey, 1999; Cummings et Relman, 2000; Lockhart et Winzeler, 2000).

Gene 1 Gene 2 Gene 3 Gene 1 Gene 2 Gene 3

Figure 1.7 Les deux principaux types de biopuces.

Légende: a, biopuces à ADN où chaque cible représente un gène complet; b, biopuces d'oligonucléotides où chaque cible représente une partie d'un gène (20-25 nucléotides). Tiré de Lockhart et Winzeler, 2000.

La photolithographie utilise la lumière ultraviolette qui passe par les trous d'un masque afin de diriger la synthèse des oligonucléotides directement sur la lame. Lorsqu'un oligonucléotide en formation a besoin d'une cytosine, par exemple, il est déprotégé par la lumière à la position désirée à l'aide d'un masque. La lame est ensuite inondée de cytosines activées qui vont aller se lier à la position déprotégée. Les cytosines non liées sont lavées et un nouveau masque est appliqué pour le prochain nucléotide à ajouter. Ces étapes sont répétées plusieurs fois à l'aide de différents masques à chaque fois afin de compléter la synthèse de tous les oligonucléotides de la lame (Pease et al., 1994; Gerhold, Rushmore et Caskey, 1999).

1.3.5.1.2 Types de marquage

Les acides nucléiques peuvent être marqués de plusieurs façons. L'ARN total peut être directement couplé par lien covalent au marqueur (contenant de la biotine et qui est détecté par conjugaison avec de la streptavidine fluorescente, donc par détection colorimétrique). D'une toute autre façon, les nucléotides marqués peuvent être incorporés

dans l'ADNc pendant (marquage direct) ou suite (marquage indirect ou à froid) à la réaction de transcription inverse (RT). Dans le cas des biopuces à déposition d'ADN, c'est souvent l'abondance relative des transcrits qui est évaluée puisque deux échantillons peuvent être marqués par des fluorochromes différents (par exemple Cy3 et Cy5) et que l'hybridation simultanée résultante s'effectue par compétition. Le ratio de fluorescence est ensuite déterminé pour chacune des biopuces (Cummings et Relman, 2000; Lockhart et Winzeler, 2000). Les biopuces à déposition d'ADN peuvent aussi être marquées à l'aide de radio-isotopes telles que le ³³P (Ye et al., 2001). Les biopuces d'oligonucléotides ne peuvent être hybridés qu'avec un seul échantillon marqué (par radioactivité ou par colorimétrie (complexe biotine-avidine-SYBR green)), mais la quantité phénoménale de contrôle interne (comme mentionné dans le paragraphe précédent) permet tout de même la mesure de l'expression génique (Cummings et Relman, 2000; Lockhart et Winzeler, 2000; Hinton et al., 2004).

1.3.5.1.3 Analyse des données

Plusieurs types d'analyse peuvent être effectués sur les données, mais pour alléger cette section et pour ne pas se perdre dans le domaine très complexe des statistiques, il ne sera question que du type d'analyse le plus fréquemment effectué.

Suite à l'hybridation, des logiciels d'analyse capturent en images l'intensité du signal de fluorescence de chacune des puces et convertissent cette dernière en données numériques (Cummings et Relman, 2000). Dans le cas des biopuces à déposition d'ADN, les lames sont balayées à deux différentes longueurs d'onde (correspondant au spectre d'absorption des fluorochromes) afin de détecter les deux fluorochromes (Lockhart et Winzeler, 2000). Les valeurs obtenues pour le bruit de fond sont soustraites des données brutes de fluorescence obtenue afin d'avoir la fluorescence nette de chaque point. Cette opération est appelée « correction du bruit de fond ou background correction » (Dharmadi et Gonzalez, 2004). Afin de pouvoir comparer différentes expériences, les données obtenues doivent absolument être normalisées pour éliminer toutes sources de variations expérimentales: processus de fabrication de la lame, erreurs systématiques lors de

l'hybridation ou des lavages, hybridation non-spécifique, contamination, etc. La normalisation permet l'établissement d'une base commune pour toute comparaison. Différentes techniques de normalisation peuvent être effectuées selon le cas. Par la suite, dépendant du nombre d'expériences à comparer, un t-test ou une analyse de la variance (ANOVA) (tests paramétriques) est effectué sur les données obtenues. Ces deux tests permettent de déterminer si les différences observées entre deux échantillons (t-test) ou plusieurs échantillons (ANOVA; \geq 3 échantillons) sont statistiquement significatives (Ye et al., 2001; Dharmadi et Gonzalez, 2004). Les résultats de biopuces à déposition d'ADN ou d'oligonucléotides sont presque toujours présentés sous forme logarithmique en base 2 (fold change) puisque cette forme est très utile lorsque des changements relatifs sont étudiés (augmentation ou diminution) comme c'est le cas pour l'analyse de l'expression génique. La forme logarithmique est aussi utilisée afin de conduire les tests paramétriques mentionnés plus tôt. En effet, il est nécessaire que les données présentent une distribution normale (en forme de cloche inversée) pour effectuer ces tests paramétriques et c'est ce que la transformation logarithmique des données parvient à effectuer. Finalement, les données sont analysées afin d'en faire ressortir des conclusions biologiques (Dharmadi et Gonzalez, 2004).

Le plus important reste la validation de l'expression différentielle des gènes d'intérêt par d'autres méthodes indépendantes telles que la mutagenèse ou encore la réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps réel (qRT-PCR) (voir section 1.3.6).

1.3.5.1.4 Les applications des biopuces

Les biopuces ont été utilisées, jusqu'à présent, dans une multitude d'expériences. Quelques exemples de ces applications sont donnés dans le tableau 1.1. Les biopuces ont grandement contribué aux études de réponses bactériennes face aux changements de conditions environnementales (profil d'expression). Des phénomènes tels que la régulation des voies métaboliques ou encore la réponse au stress sont souvent analysés par biopuces (Cummings et Relman, 2000; Kato-Maeda, Gao et Small, 2001; Lucchini, Thompson et Hinton, 2001; Ye et al., 2001; Dharmadi et Gonzalez, 2004). Les résultats

obtenus ont permis d'apporter des nouvelles informations aux connaissances actuelles quant au fonctionnement des gènes bactériens. Les études d'interaction hôte-pathogène permettent de comprendre la pathogénicité de certaines souches (facteurs de virulence) et sous quelles conditions les maladies sont causées. De plus, ces études ouvrent la porte au développement de nouveaux outils de prévention et de gestion des maladies (Cummings et Relman, 2000; Kato-Maeda, Gao et Small, 2001; Lucchini, Thompson et Hinton, 2001; Ye et al., 2001; Shoemaker et Linsley, 2002; Dharmadi et Gonzalez, 2004). L'étude du polymorphisme génétique permet de différencier, par exemple, les isolats ou souches d'une même espèce bactérienne et donc, de les caractériser (Kato-Maeda, Gao et Small, 2001; Lucchini, Thompson et Hinton, 2001; Ye et al., 2001; Dharmadi et Gonzalez, 2004). L'étude de la réponse de l'hôte est une autre application des biopuces. Elle permet de comprendre les mécanismes de défense de l'hôte tout en augmentant les connaissances, de façon indirecte, au niveau de la pathogénicité des microorganismes (Cummings et Relman, 2000; Ye et al., 2001; Shoemaker et Linsley, 2002). L'identification de nouvelles cibles dans le développement des drogues et la détermination des mécanismes d'actions de ces derniers sont des domaines qui sont de plus en plus étudiés grâce à des expériences de biopuces (Cummings et Relman, 2000; Kato-Maeda, Gao et Small, 2001; Ye et al., 2001).

Récemment, l'absence de biais lors de l'utilisation combinée de la technique de SCOTS (section 1.3.4) et des biopuces a été validée. En effet, lors d'une expérience d'infection de macrophages humains THP-1 avec la souche de Salmonella typhi ISP1820, il a été démontré que les différentes rondes de SCOTS représentait un mélange complexe d'ADNc provenant de l'infection exempt d'ADN contaminant (ADNr et ADNg par exemple) (figure 1.8). Ces résultats ont permis de prouver la pertinence de l'utilisation combinée de techniques telles que SCOTS et des biopuces lors de l'étude de l'expression des gènes in vitro et surtout, in vivo (Faucher et al., 2006).

Tableau 1.1 Exemples d'applications des biopuces.

Applications	Organismes	Type de biopuces	Références	
Profil d'expression				
Contrôle d'un régulon par un	Streptococcus	Lames de verre	(de Saizieu et al.,	
peptide autoinductible	pneumoniae	(oligos)	2000)	
Effet du stress osmotique	Y. pestis	Lames de verre (déposition)	(Han et al., 2005)	
Interaction hôte-pathogène				
Muqueuses gastriques	U milori	Membrane de	(Graham et al.,	
humaines et de gerbilles	H. pylori	nylon (déposition)	2002)	
Tractus urinaire de souris	E. coli	Lames de verre (oligos)	(Snyder <i>et al.</i> , 2004)	
Polymorphisme génétique				
Génomique comparative des	M. avium, M.	Lames de verre	(Semret et al.,	
sous-espèces	paratuberculosis	(oligos)	2004)	
Génomique comparative des	Bartonella	Lames de verre	(Lindroos et al.,	
espèces	koehlerae	(déposition)	2005)	
Réponse de l'hôte				
Tractus urinaire de souris	E. coli	Lames de verre (oligos)	(Mysorekar et al., 2002)	
Macrophages	Streptocoques	Lames de verre	(Draper, Bethea et He, 2005)	
Widelophages	du group B	(oligos)		
Identification de cibles pour	développement de d	lrogues		
	dard-perche	Lames de verre	(van der Ven et al.,	
Système nerveux	(zebrafish)	(déposition)	2005)	
Cancer	Humain	Lames de verre	(Togashi et al.,	
		(déposition)	2005)	
Diagnostic				
Détermination du pathotype	E. coli	Lames de verre (déposition)	(Bekal et al., 2003)	
Détection des souches	E. coli	Lames de verre	(Jin et al., 2005)	
oligos bionuces à haute densité d'oli	O157 :H7	(déposition)		

oligos, biopuces à haute densité d'oligonucléotides; déposition, biopuces à déposition d'ADN

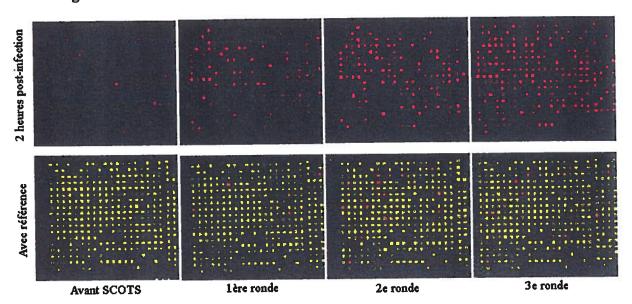


Figure 1.8 Effets des différentes rondes de SCOTS sur la population d'ADNc.

La rangée du haut présente une section des quatre différentes lames hybridées avec l'ADNc (Cy5) avant SCOTS et des différentes rondes de SCOTS, deux heures suite à l'infection des macrophages. La rangée du bas présente ces mêmes résultats avec la référence d'ADNg (Cy3) (Faucher et al., 2006).

1.3.5.2 Avantages et inconvénients

L'avantage le plus important lors de l'utilisation de biopuces est la possibilité de mesurer de façon simultanée, l'expression globale de plusieurs dizaines de milliers de séquences d'acides nucléiques différentes. De plus, l'évaluation quantitative de l'expression génique de cette technique la rend beaucoup plus avantageuse par rapport à d'autres techniques telles que IVET, STM et DFI (Kato-Maeda, Gao et Small, 2001; Hinton et al., 2004).

Les biopuces à déposition d'ADN sont beaucoup plus faciles à préparer et à construire que les biopuces à oligonucléotides, ce qui facilite leur fabrication et leur utilisation dans le secteur académique. Toutefois, plusieurs désavantages rendent cette technologie beaucoup moins précise que celle des oligonucléotides. Par exemple, il y a possibilité de variations dans la taille des puces et dans la quantité d'ADN retrouvée dans chaque puce. De plus, des variations au niveau de la longueur et de la composition des séquences des puces peuvent engendrer des problèmes de reproductibilité lors de l'analyse de résultats suite à l'hybridation de plusieurs lames (Kato-Maeda, Gao et Small, 2001) sans oublier

les problèmes de bruits de fond et la variabilité d'une série de lames à une autre (Ye et al., 2001). L'utilisation de la photolithographie permet d'avoir un plus grand nombre d'éléments sur une même matrice et d'éliminer les collections de clones et de produits de PCR qui nécessitent un temps considérable à rassembler et de la place pour l'entreposage (Cummings et Relman, 2000). Les biopuces d'oligonucléotides présentent des résultats beaucoup plus reproductibles et consistants que les biopuces à déposition d'ADN puisque plusieurs oligonucléotides sont présents pour un seul et même gène. Cette technologie permet aussi d'éviter les régions répétitives ou homologues à d'autres gènes (Gerhold, Rushmore et Caskey, 1999). D'un autre côté, cette technologie est moins flexible puisqu'elle nécessite la conception et la fabrication de masques spécifiques qui détermineront quels nucléotides doivent être synthétisés in situ. Ces masques doivent être complètement reconstruits lorsque l'on veut changer un élément dans la biopuce (Kato-Maeda, Gao et Small, 2001).

Les lames de verre offrent de précieux avantages lorsque utilisées comme matrice pour les biopuces. Elles permettent d'établir un lien covalent entre l'ADN et la surface de la lame, elles sont inertes face aux hautes températures et aux lavages à forces ioniques élevées, elles permettent de limiter la surface de diffusion pendant l'hybridation, elles procurent de faibles bruits de fond et elles permettent l'hybridation compétitive de deux populations (Gerhold, Rushmore et Caskey, 1999; Dharmadi et Gonzalez, 2004).

Dans le cas du marquage, l'utilisation de fluorochromes tels que le Cy3 et le Cy5 permettent de détecter plus d'un signal (plusieurs échantillons) à l'intérieur d'une même expérience, ce qui peut impliquer l'utilisation de moins de la radioactivité (Cummings et Relman, 2000; Lockhart et Winzeler, 2000).

La préparation de l'expérience de biopuces est critique puisque l'expression des gènes peut changer en quelques minutes. Par exemple, lors de l'extraction de l'ARN provenant d'un tissu animal, le fait de garder les échantillons sur la glace peut induire certains gènes (cold shock regulon) qui n'étaient peut être pas exprimés lors de l'infection. D'un autre côté, la demie-vie de l'ARNm, étant d'environ 5 minutes, implique une extraction rapide

avant que ce dernier ne se dégrade et n'affecte les données obtenues sur les micropuces par la suite (Hinton et al., 2004).

Par moment, le nombre élevé de données générées qui doivent être traitées peut rapidement devenir laborieux surtout pour le manipulateur inexpérimenté. Ce grand nombre de données peut aussi augmenter les risques de faux positifs dus à l'utilisation d'analyses statistiques pour faire ressortir les données d'importance. La combinaison de données provenant d'expériences indépendantes tend à réduire le nombre de résultats aberrants (Cummings et Relman, 2000). De plus, les résultats numériques sont souvent présentés sous forme de ratios, ce qui rend arbitraire la délimitation entre un gène différentiellement induit et un gène différentiellement réprimé. Le rapport entre les manifestations biologiques et ces mêmes ratios n'est pas complètement compris, mais permet malgré tout de mesurer le niveau d'ARN présent dans les tissus (Shelburne et Musser, 2004). À première vue, les coûts nécessaires pour procéder à une analyse complète par biopuces peuvent sembler excessifs, mais la quantité de données générées compense largement pour les autres méthodes de quantification qui peuvent prendre plusieurs mois de travail avant l'aboutissement à des résultats semblables (Kato-Maeda, Gao et Small, 2001).

1.3.6 qRT-PCR

La réaction de polymérase en chaîne quantitative en temps réel (qRT-PCR) est une technique qui combine l'amplification de l'ADN, la détection et la quantification d'un émetteur fluorescent dans un seul et même appareil (Bustin, 2000; Poitras et Houde, 2002). Cette technique détient ce nom à cause de son habileté à mesurer les produits de PCR au fur et à mesure qu'ils s'accumulent, donc en «temps réel». La première documentation sur la qRT-PCR remonte en 1992 (Higuchi et al., 1992). Comme ils ne disposaient pas d'appareillage à cet effet, ils avaient utilisés le bromure d'éthidium (EtBr) comme agent intercalant pendant la PCR et un thermocycleur modifié qui irradiait les

échantillons avec de la lumière ultraviolette (UV) afin de détecter le signal fluorescent résultant avec une caméra CCD (charged-couple device) (Ginzinger, 2002).

La technique de qRT-PCR peut être utilisée pour comparer le niveau de transcrits dans différentes populations d'échantillon, pour caractériser l'expression de l'ARNm, pour discriminer deux échantillons d'ARNm apparentés (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Hinata et al., 2004; Jordan et Durso, 2005), pour la détection de l'ADN lors d'études diagnostiques (Hinata et al., 2004; Jordan et Durso, 2005) et pour confirmer les résultats de biopuces à ADN (Bustin, 2000; Ginzinger, 2002; Hinata et al., 2004; Jordan et Durso, 2005).

1.3.6.1 Description sommaire de la technique

Le principe de la qRT-PCR est fort simple. En fait, c'est une réaction de PCR normale où le produit de PCR est détecté à chacun des cycles de la réaction suite à l'incorporation de marqueurs fluorescents (Schmittgen *et al.*, 2000). Durant la phase exponentielle, la réaction de PCR peut être suivie puisque l'augmentation de la quantité d'amplicons générés est directement proportionnelle à la quantité initiale de matrice utilisée (Poitras et Houde, 2002).

Deux méthodes de détection quantitative des amplicons sont couramment utilisées: les agents se liant à l'ADN double brin (ADNdb) (EtBR; YO-PRO-1; SYBR Green I) et les sondes fluorescentes (Poitras et Houde, 2002). Ces dernières impliquent un double marquage à l'aide de sondes fluorescentes (hydrolyse de sondes (*TaqMan*), hybridation de deux sondes (*HybProbes*), balises moléculaires (*Molecular Beacons*) et amorces scorpions (*Scorpion Primers*)) (Bustin, 2000; Schmittgen et al., 2000; Poitras et Houde, 2002).

Les agents se liant à l'ADNdb (figure 1.9) augmentent leur émission de fluorescence lorsqu'ils sont liés à ce dernier sans inhiber la réaction de PCR. Le SYBR Green I est le plus couramment utilisé à cause de son coût peu élevé, de sa simplicité d'utilisation et de sa grande sensibilité par rapport au EtBr. Lorsqu'il se retrouve libre en solution, le SYBR Green I exhibe très peu de fluorescence. Lors de la phase d'élongation, la fluorescence augmente due à la quantité de colorant qui se fixe à l'ADNdb naissant pour finalement décroître lorsque l'ADN est dénaturé pour le prochain cycle (Poitras et Houde, 2002).

: amplicon : ADN double brin cible fluorochrome non stimulé libro

Figure 1.9 Méthode de détection quantitative des amplicons: agents se liant à l'ADNdb.

Tiré de Poitras et Houde, 2002.

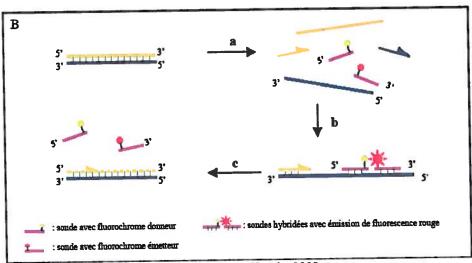
La technologie TaqMan (figure 1.10) repose sur une sonde possédant un fluorochrome émetteur (reporter) en 5', un fluorochrome suppresseur (quencher) en 3' et ayant une séquence complémentaire au brin codant. La proximité de ces deux fluorochromes permet l'inhibition de l'émission de fluorescence par l'émetteur puisque l'énergie est plutôt transmise au suppresseur qui dissipe cette énergie sous forme de chaleur (principe FRET: fluorescence resonance energy transfer). Lorsque la température d'appariement est atteinte, les amorces et la sonde se lient à leur séquence complémentaire respective. L'étape de polymérisation va déplacer la sonde et l'hydrolyser, ce qui va libérer le fluorochrome émetteur lui permettant ainsi d'émettre de la fluorescence puisqu'il sera libéré de l'environnement du suppresseur. L'émission de fluorescence augmentera donc à chaque cycle au fur et à mesure qu'il y aura de plus en plus d'amplicons (Poitras et Houde, 2002).

Figure 1.10 Méthode de détection quantitative des amplicons : hydrolyse de sondes.

Tiré de Poitras et Houde, 2002.

La technologie de l'hybridation de deux sondes (*HybProbes*) (figure 1.11) implique, comme son nom l'indique, l'utilisation de deux sondes linéaires et complémentaires à une séquence cible sur le brin codant. L'une des sondes possède un fluorochrome donneur (tel que le FITC) en 3' (prévention de son extension lors de la polymérisation par le blocage de l'extrémité 3') qui produit une fluorescence verte lorsque soumis à une source lumineuse. L'autre sonde contient le fluorochrome accepteur lié à son extrémité 5' qui possède un spectre d'émission beaucoup plus petit (rouge) que le fluorochrome donneur. L'étape d'hybridation va permettre la fixation des amorces et des sondes à leur séquence complémentaire respective qui se retrouve, dans le cas des deux sondes, à moins de 10 nucléotides dans un arrangement tête-à-queue. La proximité des deux fluorochromes va permettre le transfert d'énergie par le principe FRET qui va provoquer l'émission de fluorescence rouge par le fluorochrome accepteur. L'étape de polymérisation va briser ce lien et supprimer l'émission de fluorescence (Poitras et Houde, 2002).

Figure 1.11 Méthode de détection quantitative des amplicons: hybridation de deux sondes.



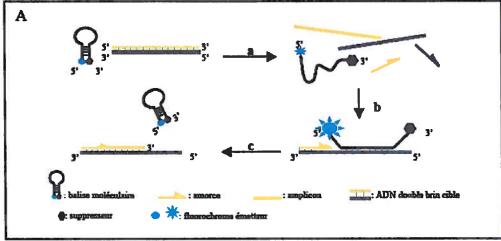
Tiré de Poitras et Houde, 2002.

La balise moléculaire (*Molecular Beacon*) (figure 1.12) est une sonde d'ADN en forme d'épingle à cheveux dont le tronc est formé de deux bras aux séquences complémentaires en plus de posséder un émetteur fluorescent (en 5') et un émetteur suppresseur (3') qui sont respectivement fixés à l'extrémité de chacun des bras. Le suppresseur est un chromophore non fluorescent dont le principe de fonctionnement est le même que dans la technologie *TaqMan* (principe FRET). En solution, la sonde adopte une conformation en épingle à cheveux. Lors de l'étape d'appariement, une conformation transitoire est adoptée puisque la sonde trouve une séquence complémentaire sur le brin codant, ce qui va séparer les deux bras et éloigner suffisamment le fluorochrome émetteur de son suppresseur afin qu'il y ait émission de la fluorescence.

Finalement, la technologie des amorces scorpion (figure 1.13) consiste en une variante de la technologie des balises moléculaires. L'extrémité 3' de la sonde qui possède le suppresseur est liée à une molécule d'hexéthylène glycol (HEG) qui agit comme un bloqueur (stopper) pour empêcher la réplication de la balise moléculaire. Ce bloqueur est suivi de l'amorce qui va permettre l'intégration de la sonde à l'amplicon en formation. La boucle de la balise moléculaire possède une séquence complémentaire à une région de

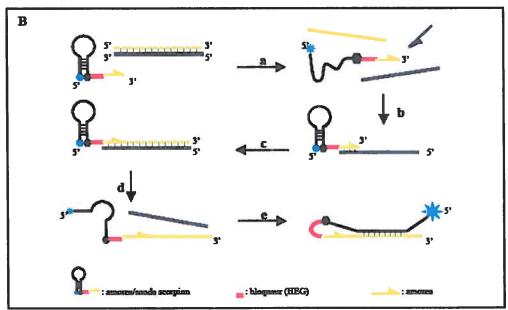
l'amplicon, ce qui va forcer l'épingle à cheveux d'adopter une nouvelle conformation et d'émettre de la fluorescence.

Figure 1.12 Méthode de détection quantitative des amplicons: balises moléculaires.



Tiré de Poitras et Houde, 2002.

Figure 1.13 Méthode de détection quantitative des amplicons: amorces scorpion.



Tiré de Poitras et Houde, 2002.

1.3.6.1.1 Analyse des données

Le logiciel enregistre le niveau de fluorescence à chaque cycle, ce qui représente la quantité de produits amplifiés. Plus il y a d'acides nucléiques au départ, plus vite le signal

de fluorescence dépassera le niveau basal de fluorescence. Le niveau d'expression des gènes peut être mesuré par quantification relative ou encore par quantification absolue. Dans le cas de la quantification absolue, la quantité d'acide nucléique mis au départ doit être connue et elle nécessite l'utilisation d'une courbe standard tandis que dans le cas de la quantification relative, ces données ne sont pas nécessaires puisque ce sont plutôt des ratios qui sont calculés. Cette dernière méthode est donc beaucoup plus facile à réaliser (Schmittgen et al., 2000). La quantification relative implique donc l'amplification d'un gène de référence (ou standard interne) contre lequel les valeurs des autres gènes peuvent être normalisées. Le standard interne idéal doit être exprimé à des niveaux constants dans différents tissus d'un organisme, à tous les stades de développement et ne devrait pas être affecté par les manipulations de l'expérimentateur. Les standards les plus utilisés pour effectuer une telle normalisation sont la glycéraldéhyde-3-phosphate-déshydrogénase (GAPDH) et la β-actine chez les eucaryotes et les ARN ribosomaux (ARNr) tel que l'ARN 16S chez les procaryotes (Bustin, 2000).

1.3.6.2 Avantages et inconvénients

Parmi les avantages les plus importants de cette technique, on retrouve sa grande sensibilité puisque la qRT-PCR peut amplifier, de façon exponentielle, de très petites quantités d'acides nucléiques. Ce dernier point met aussitôt en lumière la nature quantitative de cette technique comparativement aux autres techniques telles que IVET et DFI. En effet, la quantité de gène amplifié est directement proportionnelle à la quantité de gènes transcrits (Schmittgen et al., 2000). La qRT-PCR ne nécessite pas d'analyse des échantillons suite au PCR, ce qui rend cette technique très facile à effectuer, très flexible, non laborieuse et qui ne demande pas beaucoup de temps à préparer. De plus, l'automatisation de cette technique, de la réaction de PCR à la quantification, et l'utilisation de logiciels simples permet de simplifier l'analyse des données obtenues (Bustin, 2000; Schmittgen et al., 2000).

Toutefois, la grande sensibilité de cette technique augmente les possibilités de détection de contaminants et de faux positifs. Elle est même caractérisée par des variations

significatives et une non-reproductibilité entre les mêmes échantillons provenant de laboratoires différents (Bustin, 2000). Un facteur important pouvant empêcher un laboratoire de procéder à des analyses par qRT-PCR est le coût encore assez élevé pour se procurer l'appareil en question (Ginzinger, 2002).

Etant donnée la non-nécessité d'utiliser des sondes fluorescentes spécifiques, l'utilisation du SYBR Green I fait en sorte que la spécificité de la réaction ne repose que sur ses amorces. D'un autre côté, cet agent empêche toute discrimination des amplicons générés et des mauvais appariements possibles (faux positifs, donc surestimation de la quantification). De plus, des tailles différentes d'amplicons vont présenter des niveaux de fluorescence distincts, ce qui pourraient biaiser les résultats obtenus. Les sondes fluorescentes telles qu'utilisées dans la technologie TaqMan, par exemple, ont une spécificité accrue à cause de leur complémentarité, ce qui leur offre une meilleure capacité de multiplexage (utilisation de fluorochromes émetteurs distincts liés à des sondes différentes dans une même réaction). Cette dernière caractéristique permet aussi de réduire considérablement l'émission de fluorescence due à des mauvais appariements. Dans le cas de l'hybridation de deux sondes, des balises moléculaires et des amorces scorpion, comme les sondes ne sont pas hydrolysées, elles peuvent être réutilisées à chaque cycle. Pour les sondes fluorescentes, un des grands désavantages est la nécessité de faire le design des sondes d'hybridation, ce qui est de la plus haute importance pour la technologie des balises moléculaires. En effet, un mauvais design pourrait faire en sorte que le tronc adopte une conformation non adéquate qui éloignerait le fluorochrome émetteur du suppresseur, d'où un bruit de fond résultant (Bustin, 2000; Poitras et Houde, 2002).

Une étude de Thelwell et al. a établi que la technologie des amorces scorpion semblait plus efficace que celle du *TaqMan* et des balises moléculaires lorsque des cycles de PCR très courts étaient utilisés (Thelwell et al., 2000). Il a été démontré, lors d'une étude de dégénérescence de l'ARNm que la technique du SYBR green semblait beaucoup plus précise que celle du *TaqMan* et qu'elle produisait une courbe de dégénérescence beaucoup plus linéaire (Schmittgen et al., 2000).

Les techniques de SCOTS, des biopuces et de la qRT-PCR ont été choisies afin de mener à bien le présent projet de recherche. La technique de SCOTS a permis de capturer les transcrits procaryotes au niveau de la vessie et des reins lors de l'infection du tractus urinaire de souris. Les biopuces ont permis d'évaluer l'expression différentielle de ces transcrits, puis la technique de qRT-PCR a permis de confirmer les résultats obtenus lors de l'expérience des biopuces. Les détails des manipulations effectuées, les résultats obtenus et l'évaluation de ces résultats sont expliqués dans les sections qui suivent.



Toutes les étapes concernant l'infection des souris (de la préparation de l'inoculum au prélèvement des organes d'intérêt) ont été effectuées dans le laboratoire du Dr James R. Johnson par la technicienne Connie Clabots (*Veterans Affairs Medical Center, Minneapolis, Minnesota, USA*). Les étapes concernant la culture in vitro et toutes les étapes subséquentes à l'infection des souris ont, quant à elles, été effectuées dans le laboratoire du Dr Charles M. Dozois.

2.1 Souches bactériennes et conditions de culture

C'est la souche bactérienne *E. coli* CFT073 (O6:H1:K2) qui a été utilisée tout au cours de cette expérience. Elle a été isolée d'un cas de pyélonéphrite aiguë à l'hôpital de l'Université du Maryland (Mobley *et al.*, 1990). Son séquençage et les résultats obtenus par rapport à ce dernier ont été publiés en 2002. Son génome fait 5,23 Mb (figure 1.1) et contient presque 1 Mb de plus que la souche de laboratoire *E. coli* K-12. (Welch *et al.*, 2002). Le plasmide pC6 contient l'opéron *rrnB* (Daigle, Graham et Curtiss, 2001). Il est utilisé comme source d'ADN ribosomal (ADNr) lors de la technique de SCOTS (section 2.4.1) et il a été fourni gracieusement par le laboratoire du Dr Catherine Squires de l'Université Tufts.

2.1.1 Préparation de la culture in vitro

Une préculture de la souche *E. coli* CFT073, provenant d'un bouillon Luria-Bertani (LB/Difco), a été utilisée afin d'inoculer un autre bouillon LB de 100 ml à 1%. Ce dernier a ensuite été incubé pendant toute la nuit en agitation à 37°C. Suite à cette incubation, la densité optique à 600 nm (D.O.₆₀₀) (spectrophotomètre *Thermo Spectronic Genesys 20*) de la culture de nuit fut prise afin de s'assurer qu'il y avait au moins 1x10° bactéries/ml dans le bouillon (D.O.₆₀₀ entre 0,6 et 0,8). Ce nombre minimal de bactérie était nécessaire afin d'avoir une assez bonne quantité d'ARN lors de l'extraction, ce qui devenait un paramètre important pour la suite des expériences (voir section 2.3).

2.1.2 Préparation de l'inoculum (pour l'infection des souris)

Une préculture de la souche E. coli CFT073 a servi à l'inoculation d'un bouillon LB (Fisher) de 500 ml (à 0,2%) qui fut incubé avec agitation à 37°C pendant toute la nuit. Le lendemain, la culture de nuit a été centrifugée à 1 400 x g pendant 30 minutes (Sorvall RC-3B Centrifuge). Le plus de surnageant possible a été retiré et le culot resuspendu dans la goutte restante. Le culot resuspendu a été transféré dans un tube conique de 50 ml afin de recentrifuger pendant 10-15 minutes dans les mêmes conditions. Le surnageant a été retiré et le culot légèrement mélangé afin de le resuspendre dans la goutte restante. Le culot fut transféré dans un tube conique de 15 ml (le volume se situait entre 7 et 10 ml). Le tube conique de 50 ml était bien rincé avec un peu de tampon phosphate salin (capsules de tampon phosphate salin (PBS/phosphate buffered saline)/Sigma) afin de bien ramasser les restes de culot et de les ajouter au tube conique de 15 ml. Ce dernier tube était bien homogénéisé au vortex afin que l'inoculum ne bloque pas la pompe lors de l'infection des souris. Afin de pouvoir calculer le nombre de bactéries données à chaque souris, des dilutions de l'inoculum de départ étaient préparées afin de permettre un comptage bactérien. Pour ce faire, 10 µl des dilutions 10⁶ à 10⁹ de l'inoculum de départ furent ensemencés sur des géloses-sang (Fisher) en duplicata, puis incubés pendant toute la nuit à 37°C.

2.2 Infection du tractus urinaire des souris

L'infection du tractus urinaire de la souris a été effectuée selon un protocole bien établi (Hagberg et al., 1983). L'ensemble des manipulations qui suivent ont été effectuées à l'intérieur d'une hotte biologique à flux laminaire afin d'éviter toute contamination microbienne provenant du milieu ambiant.

2.2.1 Anesthésie des souris

Pour procéder à l'infection ascendante du tractus urinaire, une dizaine de souris femelles CBA/J âgées de 6 à 7 semaines (*The Jackson Laboratory, Maine, USA*) ont été utilisées. Un cocktail de kétamine/xylazine (*Burns Veterinary Supply Inc.*) était préparé préalablement de la façon suivante : 7,6% kétamine, 5% de xylazine et l'ajustement du reste du volume avec du PBS 0,01 molaire (M). Dans notre cas, un cocktail d'à peu près 5 ml était suffisant afin d'anesthésier toutes les souris. La kétamine agit comme anesthésiant et la xylazine permet aux souris d'avoir un meilleur contrôle de leur respiration (respiration plus lente) (site internet #2). Chaque souris était pesée et la valeur obtenue était notée soigneusement. Le cocktail était injecté au taux de 0,0125 ml/g de souris, 5 à 10 minutes avant la cathétérisation de chaque souris individuelle.

2.2.2 Préparation du système injectant l'inoculum

L'inoculum était administré dans la vessie de la souris via une pompe Harvard qui délivrait le liquide à partir d'une seringue à flux à taux fixe. Une aiguille de 30 gauge (G) (Fisher) était placée à l'extrémité mâle d'un tube d'extension (extension tube set/VWR), puis 3 ml d'inoculum était utilisé afin de remplir l'extension (sans faire de bulles), à partir de l'extrémité femelle, à l'aide d'une seringue de 3 centimètres cubes (cc) (Fisher). Une seringue de verre (Fisher) (stérile et lubrifiée avec du glycérol) était remplie à son tour de 3 ml d'inoculum à l'aide d'une aiguille de 15 G (Fisher). Cette aiguille était ensuite retirée afin d'attacher délicatement la seringue de verre à l'extrémité femelle de l'extension. La seringue de verre était ensuite attachée à la pompe Harvard (Harvard Apparatus/Massachusetts, USA). Le taux de délivrance de la pompe était fixée à 1 µl/2,4 sec (~0,5 µl/sec). L'extrémité mâle de l'extension (avec l'aiguille de 30G), était placée dans une boîte de pétri stérile afin de délivrer une certaine quantité d'inoculum pour garder un flux constant de la pompe pendant la cathétérisation de la souris.

2.2.3 Cathétérisation

Tous les instruments chirurgicaux (daviers et pinces) nécessaires à l'injection de l'inoculum furent stérilisés en les trempant dans de l'éthanol absolu, puis dans un stérilisateur à billes (Fine Science Tools). Comme mentionné précédemment (section 2.2.1), chaque souris était pesée, numérotée (sur la queue par un code précis) et anesthésiée. L'aire de l'urètre (petite ouverture au-dessus du canal vaginal) était soulevée à l'aide d'une pince stérile à bout pointu d'une main. De l'autre main, un bout de cathéter (tube de polyéthylène de 2,5 centimètres (cm) stérilisé au gaz/VWR) était inséré dans l'ouverture de l'urètre à l'aide d'une pince stérile à pointe fine. Le cathéter était considéré bien en place lorsqu'il y avait une certaine résistance à 10-15 mm de l'ouverture et qu'il tenait bien en place par lui-même. Préalablement à l'infection, la vessie de chaque souris était vidée de son urine par une légère compression de l'abdomen. Cette urine était récoltée dans un tube de 1,5 ml préalablement identifié afin de l'étaler sur une gélose sang et d'en évaluer la stérilité avant l'infection.

2.2.4 Injection de l'inoculum

La pompe était brièvement fermée afin d'insérer délicatement l'aiguille de 30 G dans le cathéter. Lors de la réouverture de la pompe, le temps était marqué afin de délivrer $1 \mu l/g$ de souris (rappel: le taux d'injection était de $1 \mu l/2,4$ sec ou $\sim 0,5 \mu l/sec$). Au bout du temps convenu d'inoculation, la pompe était fermée et le cathéter retiré de la souris. Une autre souris était anesthésiée pour plus tard, la pompe était réouverte et la cathétérisation reprenait avec une souris préalablement endormie. Toutes les souris étaient infectées pendant 48 heures.

2.2.5 Vérification de la stérilité de la souris avant l'infection

La stérilité des souris avant l'infection étant importante, d'où la vérification par comptage des colonies sur gélose-sang. À l'aide d'une pipette automatique, le volume d'urine était approximativement évalué et noté. Puis le volume d'urine obtenu était amené à 50 µl avec

du PBS stérile. Une gélose sang était inoculée à l'aide de 10 μl de cette urine diluée et le reste était conservé à 4°C dans le cas où un trop grand nombre de colonies nécessiterait une plus grande dilution de l'urine et un réensemencement sur gélose sang. Les boîtes de pétri étaient incubées à 37°C pendant 24 heures. Suite à cette incubation, le nombre de colonies sur chaque boîte était calculé et noté. Pour les boîtes contenant au-delà de 300 colonies, trois dilutions (1/10, 1/100 et 1/1000) étaient effectuées et 10 μl de chacune de ces dilutions étaient inoculées sur des géloses-sang et incubées comme précédemment.

2.2.6 Prélèvement des organes et de l'urine

Préalablement au prélèvement de la vessie et des reins, chaque souris était anesthésiée grâce à ~ 0,25 ml du cocktail anesthésiant kétamine/xylazine (voir tableau 3.2). Après 5 minutes sous anesthésie, chaque souris recevait 0,1 ml d'Euthasol® (phenytoin sodium) (Delmarva Laboratories inc.) intrapéritonéalement. Le phenytoin sodium est un anticonvulsant, souvent utilisé chez les épileptiques, qui a permis de prévenir l'agitation et la perte d'urine dans le cas de la souris (site internet #4). Pour chaque souris, la vessie et les deux reins étaient prélevés. Un écouvillon transportable stérile (Fisher) était frotté sur chaque rein et la cavité adjacente afin d'en vérifier la stérilité sur gélose sang. Chaque organe était coupé en deux afin de mettre une moitié dans un tube contenant 2 ml de TRIzol (Invitrogen) qui était rapidement mis dans de l'azote liquide et de laisser l'autre moitié dans un pétri qui se trouvait dans un bac de glace. Dans le cas de la vessie, elle était prise doucement sur le côté à l'aide de forceps, puis percée avec une seringue de 1 cc (dont l'aiguille de 18 G avait été remplacée par une aiguille de 30 G) afin d'aspirer l'urine qui était ensuite déposée dans un tube de 1,5 ml. La vessie était ensuite prélevée et coupée en deux afin de subir le même traitement que les reins. À l'aide d'une pipette automatique, le volume d'urine était évalué de façon approximative et notée. Ce volume obtenu était amené à 50 µl avec du PBS stérile, puis 25 µl était placé dans un tube de 2 ml de TRIzol et l'autre moitié demeurait dans le tube de 1,5 ml que l'on mettait sur glace.

2.2.7 Comptage bactérien

Dans le cas de l'urine, 15 μl du 25 μl gardé sur glace était mis sur une gélose sang. Le reste était conservé à 4°C dans le cas où il faudrait diluer davantage. Les sections de reins et de vessies étaient pesées et les valeurs étaient notées. Tous ces tissus étaient ensuite homogénéisés avec un broyeur de tissus stériles (*Tenbrook Tissue Grinders/PGC Scientifics*). Au cours de cette homogénéisation, 1 ml de PBS stérile était ajouté, puis l'homogénéisation reprenait son cours. Le liquide obtenu était placé dans un tube de 1,5 ml stérile, puis on inoculait respectivement 10 μl et 100 μl sur des géloses-sang. Le reste du liquide était conservé à 4°C dans le cas où il faudrait diluer davantage. Tous les pétris étaient incubés à 37°C pendant 24 heures. Suite à cette incubation, un comptage des colonies était effectué et dans le cas où on retrouvait plus de 300 colonies, des dilutions étaient effectuées afin de réensemencer d'autres géloses-sang comme expliqué auparavant à la section 2.2.5.

2.3 Extraction/purification de l'ARN et synthèse de l'ADNc

Cinq vessies et cinq reins ont été choisis parmi les souris les plus infectées (voir tableau 3.3) afin de procéder aux étapes d'extraction d'ARN, de purification d'ARN et de synthèse d'ADNc.

2.3.1 Extraction de l'ARN

Les prochaines étapes ont été effectuées autant pour les organes et la culture in vitro à l'exception de l'étape d'extraction de départ qui était différente dans les deux cas. Dans le cas des organes congelés à -80°C dans du TRIzol, les morceaux de tissus ont été broyés grâce à un homogénéisateur (Tissue Tearor/Biopsec Products Inc) jusqu'à l'obtention d'une consistance liquide, puis l'homogénat obtenu a été transvidé dans un tube de 2 ml. Les tubes ont été centrifugés à 12 000 x g pendant 15 minutes à 4°C (Eppendorf Centrifuge 5417C), puis le surnageant a été récupéré dans un tube de 1,5 ml. Dans le cas

de la culture in vitro, les cellules en suspension dans le bouillon ont été centrifugées afin d'obtenir un culot bactérien (2000 x g, 10 minutes à température pièce/Eppendorf Centrifuge 5810R). Le surnageant a été retiré et le culot lysé à l'aide d'une pipette en ajoutant du TRIzol (1 ml de TRIzol/1x107 bactéries). Suite à cette lyse, le tout a été laissé en repos pendant 5 minutes à température pièce. Dans les deux cas (in vivo et in vitro). 0,2 ml de chloroforme a été ajouté par millilitre d'homogénat. Les tubes ont ensuite été agités manuellement et vigoureusement pendant 2 minutes, puis incubés sur glace pendant 5 minutes. Ils ont ensuite été centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 x g et à 4°C, puis la phase aqueuse (~ 450 à 500 μl) a été prélevée dans un nouveau tube propre. Une quantité équivalente à la phase aqueuse prélevée d'isopropanol (préalablement conservé à -20°C) a été ajoutée, puis les tubes agités pendant quelques secondes ont été laissés à -20°C pendant 1 heure. Ensuite, ils sont centrifugés pendant 15 minutes à 12 000 x g et à 4°C, puis le surnageant transvidé afin de ne garder que le culot qui est séché à l'air pendant environ une dizaine de minutes. Le culot était ensuite nettoyé à l'éthanol 75% (conservé à -20°C et préparé avec de l'eau-diethylpyrocarbonate (eau-DEPC) pour enlever les ribonucléases (RNases) de l'eau), puis centrifugé pendant 5 minutes à 7 000 x g. Le surnageant était ensuite retiré et le culot séché pendant 10 minutes. Afin de resuspendre le culot d'ARN, 25 µl d'eau-DEPC était ajouté au tube et la D.O. était évaluée (SmartSpecTM Plus Spectrophotometer/Bio-Rad).

2.3.2 Purification de l'ARN

Les échantillons d'ARN ont ensuite subi un traitement à la désoxyribonucléase recombinante (rDNase) I grâce à la trousse *DNA-free* (*Ambion*) afin d'enlever la contamination d'ADNg qui aurait subsisté suite à l'extraction d'ARN. Pour ce faire, 0,1 volume du tampon 10X de désoxyribonucléase (DNase) I était ajouté et 0,5 µl de l'enzyme rDNase I, puis le tout était incubé à 37°C pendant 30 minutes. Un autre volume de 0,5 µl d'enzyme était ajouté, puis une nouvelle incubation à 37°C pendant 30 minutes était effectuée. Ces deux incubations permettaient de digérer l'ADN contaminant. Ensuite, 0,1 volume de solution d'inactivation de l'enzyme (*DNase Inactivation Reagent*) était ajouté et le tube était incubé 2 minutes à température pièce avec mixage occasionnel.

Le tube était centrifugé à 10 000 x g pendant 2 minutes à 4°C afin de faire culotter la solution d'inactivation, puis le surnageant était transféré délicatement à l'aide d'une pipette dans un tube propre de 1,5 ml.

2.3.3 Synthèse de l'ADNc

Chaque échantillon (les cinq vessies, les cinq reins et la culture in vitro) était séparé dans 5 tubes de 0.2 ml afin d'avoir une meilleure diversité dans l'ADNc produit par réaction de polymérase en chaîne par transcription inverse (RT-PCR). À 5 µg d'ARN total, traité à la rDNase I, était ajouté 2 µl d'amorces RB1 dans le cas des organes et 2 µl d'amorces NKPN1 dans le cas du in vitro (voir tableau 2.1). Ces tubes étaient incubés 10 minutes à 70°C. 2 minutes sur glace, puis rapidement centrifugé (quick-spin). La trousse de Superscript II RNase H Reverse Transcriptase d'Invitrogen a été utilisée pour la suite de l'expérience afin de synthétiser le premier brin d'ADNc. Des volumes de 2,5 µl d'un mélange de dNTP (dATP, dCTP, dTTP et dGTP tous à 10 mM dans la solution finale), 5 ul de tampon RT 5X (inclus dans la trousse), 2 µl de DTT 0,1M (inclus dans la trousse) et 0,5 µl de l'inhibiteur de RNase (RNaseOut Ribonuclease Inhibitor/Invitrogen) ont été ajoutés au tube d'ARN. Le tout était incubé 10 minutes à 25°C, puis 2 µl de RT Superscript II étaient ajoutés. Trois incubations successives étaient effectuées: 10 minutes à 25°C, 50 minutes à 45°C et 15 minutes à 70°C. Pour la synthèse du second brin, l'ADN était dénaturé pendant 2 minutes, puis les éléments suivants étaient ajoutés : 62 µl d'eau, 1 µl d'un mélange de dNTP (comme précédemment), 10 µl de tampon 10X Klenow (New England BioLabs, inclus avec l'enzyme) et 2 µl d'enzyme Klenow 10U (DNA Polymerase I Large Fragment/New England BioLabs). Le tout était incubé pendant 30 minutes à 37°C.

Tableau 2.1 Liste des amorces utilisées pour la synthèse d'ADNc et la vérification des rondes de SCOTS.

Nom de l'amorce	Séquence	Utilisation	Référence
RB1-RNA primer	5'-CGGGATCCAGCTTCTCACGCANNNNNNNNN-3'	*RT-PCR	(Daigle, Graham et Curtiss, 2001)
NKPN1-RNA primer	5'-GTGGTACCGCTCTCCGTCCGANNNNNNNNN-3'	*RT-PCR	(Daigle, Graham et Curtiss, 2001)
RB1-PCR primer	5'-CGGGATCCAGCTTCTCACGCA-3'	**PCR	(Daigle, Graham et Curtiss, 2001)
NKPN1-PCR primer	5'-GTGGTACCGCTCTCCGTCCGA-3'	**PCR	(Daigle, Graham et Curtiss, 2001)

^{*} RT-PCR = réaction de polymérase en chaîne par transcription inverse

2.3.4 Purification de l'ADNc et vérification sur gel d'agarose

Les ADNc ont été purifiés afin d'éliminer les amorces utilisées dans la réaction de RT-PCR à l'aide de la trousse *QlAquick PCR purification* (*Qiagen*). Ensuite, un PCR de 25 cycles (avec les amorces à PCR du tableau 2.1) a été effectué avec la phase de dénaturation à 94°C pendant 45 secondes, la phase d'hybridation à 60°C pendant 60 secondes, la phase d'élongation à 72°C pendant 60 secondes et une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C. Quelques microlitres (3 μl) des produits de PCR étaient déposées dans un gel de 1,2% additionné EtBr (concentration finale de 0,5 μg/ml) d'agarose afin de vérifier que le patron présenté formait une traînée d'ADN, ce qui suggérait une bonne diversité de fragments d'ADNc suite au RT-PCR.

2.4 SCOTS

Trois rondes indépendantes de SCOTS ont été effectuées pour l'ADNc provenant de chaque condition. Dans le cas des organes, la première ronde impliquait cinq réactions indépendantes de SCOTS puisqu'il y avait 5 organes autant pour les vessies que pour les reins. À la fin de cette première ronde, les cinq tubes étaient mélangés ensemble en un seul tube pour effectuer les rondes 2 et 3 de SCOTS. En ce qui concerne la culture in vitro, une seule réaction a eu lieu à chaque ronde.

^{**} PCR = réaction de polymérisation en chaîne

2.4.1 Photobiotinylation

Il fallait prévoir 0,3 µg d'ADNg de la souche E. coli CFT073 et 5 µg d'ADNr (plasmide pC6) par ronde de SCOTS (Daigle, Graham et Curtiss, 2001) afin de bloquer le plus de sites ribosomaux sur l'ADNg. Un volume égal d'ADNg et de solution d'acétate de photobiotine (Sigma), préalablement préparée avec de l'eau distillée stérile à une concentration de 1 µg/ml, furent ajoutés dans un tube de 0,2 ml. Ce tube fut placé à l'envers (la tête du tube vers le bas pour que le liquide dans le fond du tube puisse être visible) dans un bain de glace pendant 20 minutes à 2-3 cm sous une source lumineuse incandescente de 250 Watts. Puis, un volume identique d'acétate de photobiotine était de nouveau ajouté au précédent mélange et une nouvelle incubation de 20 minutes sous la même source lumineuse avait lieu. Cette deuxième étape permettait de s'assurer d'une photobiotinylation adéquate de l'ADNg. Suite à cette deuxième incubation, le mélange ADNg-acétate de photobiotine était transféré dans un tube de 1,5 ml. Du tampon Tris-EDTA (TE) à pH 9,0 y était ajouté afin de diluer le mélange du départ d'un facteur de 10 (dilution 1/10). La solution était ensuite extraite à l'aide de 200 µl d'isobutanol saturée en eau à plusieurs reprises (3-4 fois) jusqu'à ce que la solution devienne claire. L'ADNr était ensuite ajouté au taux de 17:1, donc 5 µg d'ADNr pour 0,3 µg d'ADNg comme mentionné précédemment. Le mélange résultant était ensuite soniqué de façon à obtenir des fragments d'ADN qui feraient une traînée d'ADN se situant autour de 200 pb sur un gel d'agarose de 1,2%. La solution biotinylée et soniquée était finalement précipitée jusqu'à son utilisation subséquente.

2.4.2 Normalisation

Pour ces manipulations, il fut important de garder les tubes sur glace entre chaque étape d'incubation. Les tubes d'ADN biotinylé et les tubes d'ADNc (qui précipitaient à -20°C) ont été centrifugés pendant 10 minutes à 20 800 x g à 4°C. Le surnageant de chacun des tubes a été retiré et le culot lavé avec 500 µl d'éthanol 70% (conservé à -20°C). Le tube était ensuite de nouveau centrifugé pendant 10 minutes à 20 800 x g à -20°C. Le surnageant était retiré, le culot séché pendant 10-20 minutes en gardant les tubes ouverts

sur un portoir sous la flamme pour éviter des contaminations (emplacement du culot était marqué sur le tube). Une fois le culot séché, 4 µl de tampon d'hybridation 1X (10 mM EPPS [N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N'-(3-propanesulfonic acid)]; 1 mM EDTA; pH 8,0) était ajouté directement sur le culot, incubé pendant 2 minutes, mélangé légèrement avec la pipette, puis transférer dans un tube de 0,2 ml. Une goutte d'huile minérale était ensuite ajoutée, le tube centrifugé rapidement (quick-spin), puis dénaturé par une incubation à 99°C pendant 3 minutes. Il y était ajouté 1 µl de NaCl 1 M, puis chaque échantillon a été incubé à 65°C pendant 30 minutes. Cette étape de normalisation (ou « self-annealing ») permettait de réduire la quantité d'ADNc qui correspondait à des transcrits plus abondants et d'augmenter l'ADNc qui se retrouvent en plus faible quantité. Suite à cette dernière incubation, 5 µl du mélange ADNg-ADNr était prélevé et ajouté à un tube d'ADNc afin d'hybrider le tout à 65°C pendant toute la nuit.

2.4.3 Capture (SCOTS)

La figure 1.6 illustre les grandes étapes de la technique de SCOTS. Préalablement à la capture, il était nécessaire de préparer les billes recouvertes de streptavidine qui allaient permettre la capture subséquente. Pour ce faire, il fallait mélanger, délicatement avec une pipette, les billes (*MagneSphere Magnetic Separation Products/Promega*) dans la solution initiale (2X) dans laquelle elles baignaient. La concentration initiale était de 1 µg/ml et il fallait 60 µg de billes par réaction de capture, donc 60 µl de la solution initiale de billes par réaction de capture. Par la suite, 120 µl de cette solution étaient placés dans un tube de 1,5 ml (1 tube par 2 réactions de capture) selon le nombre d'expériences à effectuer. Les tubes de 1,5 ml étaient placés dans un support aimanté (*Dynal MPC-S*) pendant 1 minute afin d'enlever par aspiration le surnageant et de laver les billes avec 500 µl de tampon de liaison et de lavage 1X (10 mM Tris-Cl pH 7,5; 1 mM EDTA; 2,0 M NaCl). La solution était mélangée délicatement et le tube était replacé dans le support aimanté pour une autre minute, le surnageant retiré et le culot resuspendu dans 1 ml de tampon de liaison et de lavage 2X.

Les tubes gardés à 65°C la veille (section 2.4.2) ont été centrifugés rapidement (quick-spin). L'ADNc était délicatement aspiré à l'aide d'une pipette (~ 10 μl) et dilué dans 500 μl d'eau. Il y était ajouté 500 μl de billes et le tout était mélangé. Les tubes étaient ensuite incubés pendant 10 minutes à 37°C. Les étapes de lavage subséquentes consistaient à capturer sur le support aimanté pendant 1 minute, enlever le surnageant, ajouter 500 μl de tampon de lavage (20 mM NaCl; 0,1% SDS), préalablement incubé à 65°C, mettre les tubes à 65°C pendant 15 minutes et refaire ces étapes au complet 2 autres fois. Pour éluer l'ADNc capturé, il fallait enlever le surnageant à l'aide de la pipette, ajouter 100 μl de NaOH 0,4 N frais, incuber à 37°C pendant 10 minutes, récolter le surnageant dans un nouveau tube de 1,5 ml sans prendre le culot, centrifuger rapidement (quick-spin) à 1 000 x g afin de faire culotter les billes, puis finalement, de récolter le surnageant dans un nouveau tube 1,5 ml. Finalement, on faisait précipiter l'ADNc en ajoutant au tube 250 μl d'éthanol 100% froid (-20°C), 10 μl d'acétate de sodium 3M et 1 μl de glycogène (10 μg) pour finalement brasser le tube manuellement et le mettre à -20°C pendant toute la nuit.

2.4.4 Vérification de la ronde de SCOTS

Les échantillons qui ont précipité pendant toute la nuit étaient centrifugés pendant 10 minutes à 20 800 x g à 4°C, lavés avec 500 µl d'éthanol 70% froid (-20°C), puis centrifugés de nouveau (comme précédemment). Le culot était séché pendant 5-10 minutes, resuspendu dans 40 µl de tampon TE (pH 7,4), solubilisé pendant 10 minutes à température pièce. Un PCR était ensuite effectué en duplicata (section 2.3.4). Les résultats du PCR étaient vérifiés en mettant 3 µl provenant de chaque réaction dans un gel d'agarose de 1,2% additionné de EtBr. Un étalement de fragments d'ADN autour du 200 pb devait être visible dans tous les cas. Toutes les réactions de PCR étaient ensuite purifiées comme à la section 2.3.4 à raison d'une colonne de purification pour deux réactions de PCR identiques. Une vérification à l'aide de la technique de Southern blot (Southern, 1975) permettait aussi d'observer la diversité des fragments et surtout, la spécificité d'hybridation des produits de SCOTS générés sur l'ADNg de CFT073.

2.4.4.1 Hybridation Southern

L'analyse par hybridation Southern a été effectuée à l'aide de la trousse DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Molecular Biochemicals) selon le protocole du manufacturier. L'ADNg de la souche de E. coli CFT073 a tout d'abord été digéré à l'aide de l'enzyme de restriction PstI, puis cette digestion a subi une migration sur un gel d'agarose de 0,7% pendant environ 22 heures à 30V. Une coloration au EtBr (0,5 μg/ml) et une visualisation du résultat aux ultraviolets ont permis de vérifier la digestion complète de l'ADNg (observation d'un étalement d'ADN tout le long du gel). L'ADNg du gel d'agarose a été transféré pendant toute une nuit par capillarité sur une membrane de nylon, chargée positivement, imbibée de tampon SSC 20X (3 M NaCl; 300 mM sodium citrate; pH 7,0). Afin de fixer l'ADN sur la membrane, cette dernière a été exposée aux UV pendant 30-60 secondes à 150 millijoules (GS Gene Linker UV Chamber/BioRad). Par la suite, la membrane a été préhybridée à 42°C pendant 30 minutes dans du tampon DIG Easy Hyb (fournit dans la trousse). L'hybridation de la membrane préalablement coupée en diverses petites bandelettes se faisait avec plusieurs sondes. L'ADNc des trois rondes de SCOTS et l'ADNc de départ étaient marqués par PCR avec des dUTP DIG (Roche Molecular Biochemicals) tandis que l'ADN plasmidique (pC6), contenant l'opéron ribosomal, était marqué de façon aléatoire (un marqueur DIG à chaque 20-25 nucléotides) avec la solution DIG-High Prime labeling mix (fournie dans la trousse). Les différentes sondes étaient ensuite dénaturées, puis chacune d'elles étaient mises en contact avec une des bandelettes pour une hybridation à 42°C pendant toute la nuit. Suite à cette incubation, les bandelettes de nylon ont été lavées à plusieurs reprises avec des tampons de différentes stringences, puis l'hybride sonde/cible a été visualisé par chimioluminescence (ChemiGenius²-Bio Imaging System/Syngene) avec un temps d'exposition variant de 10 à 20 minutes tout dépendant du résultat obtenu. Pour ce faire, anticorps anti-DIG (Anti-Digoxigenin-Alkaline Phosphatase Antibody/Roche Molecular Biochemicals) couplés à la phosphatase alcaline se liaient aux sondes marquées au DIG. L'ajout du substrat chimioluminescent de la phosphatase alcaline, le CSPD (chemiluminescent alkaline phosphatase substrate), permettait de générer de la lumière qui pouvait ensuite être visualisée. Une fois l'analyse des résultats terminée, les sondes ont ensuite été déshybridées des bandelettes à l'aide d'un tampon (stripping buffer: 0,2 M NaOH; 0,1% SDS) pour utilisation ultérieure dans une autre expérience d'hybridation.

2.5 Biopuces à ADN

Les lames utilisées pour l'expérience de biopuces à ADN contenaient l'ensemble des 4 290 cadres de lecture ouverts de la souche *E. coli* K-12 MG1655 (*Gene Expression Center/University of Wisconsin*). Notre projet de recherche ciblait donc l'expression des gènes conservés. En tout, neuf lames ont été utilisées pour l'hybridation: trois lames avec l'ADNc provenant des vessies, trois lames avec l'ADNc provenant des reins et trois lames avec l'ADNc provenant de la culture in vitro.

2.5.1 Marquage des sondes SCOTS et de la sonde génomique

Le volume d'ADN des sondes était ajusté à 21 μl avec de l'eau stérile, puis 20 μl de tampon de réaction 2,5X (Reaction buffer mix 2,5X) étaient ajoutés. Ce tampon contenait 12 μl d'hexamères aléatoires (pd(N)₆ Random Hexamer 5'-Phosphate, Sodium Salt/Amersham Biosciences); 5 μl de tampon Tris-HCl 500 mM pH 6,8; 2 μl de MgCl₂ 125 mM et 1 μl de 2-mercaptoéthanol (ME) 500 mM par réaction de marquage. L'ADN était dénaturé par ébullition pendant 5 minutes et mis sur glace 1-2 minutes. Un volume de 5 μl de chaque dNTP (dATP, dCTP et dGTP) à 10mM était ajouté dans chaque tube suivi de 2 μl de CyDye Cy3-dUTP (Amersham Biosciences) dans le cas de l'ADNg ou de CyDye Cy5-dUTP (Amersham Biosciences) dans le cas de l'ADNc d'une des conditions à l'étude et finalement 2 μl d'enzyme Klenow (DNA Polymerase I Large Fragment (50 000U/ml)/New England BioLabs) étaient ajoutés. Les tubes étaient incubés dans un bain à 37°C pendant toute la nuit.

2.5.2 Préhybridation et hybridation des lames

Une étape de préhybridation avait lieu en incubant chaque lame dans un tube conique de 50 ml contenant la solution de préhybridation (12,5 ml de formamide (*Invitrogen*); 25 mg d'albumine sérique bovine (BSA / bovine serum albumin); 1 ml de SDS 10% et 12,5 ml de SSC 20X dans un volume final de 50 ml et préchauffée à 42°C depuis la veille) pendant 45 minutes dans un bain d'eau à 42°C. Par la suite, la lame était lavée dans deux bains d'eau avant d'être séchée dans un tube conique vide de 50 ml par centrifugation à 4 000 x g pendant 20 minutes (*Beckman model TJ-6 Centrifuge*). Les lames, les chambres à hybridations (*Corning*) et les lamelles (*Lifter Slip/Erie Scientific Company*) étaient dépourvues de toute poussière avec de l'air comprimé, puis le montage pour l'hybridation était préparé (lamelle placée sur la lame dans la chambre à hybridation) en ajoutant 15 μl d'eau dans chacun des trous situés de part et d'autre de la chambre à hybridation.

Pendant ce temps, chaque réaction de marquage était arrêtée en ajoutant 5 ul de EDTA 0,5M à pH 8,0, puis les sondes étaient purifiées et éluées dans un volume de 20 µl d'eau à l'aide de la trousse de purification de PCR (MinElute PCR Purification Kit/Oiagen). Chaque lame était hybridée, d'une part, avec 1 µg d'ADNg de la souche E. coli CFT073 (dans tous les cas) et, d'autre part, avec 1 µg d'ADNc d'une des trois conditions à l'étude : vessie, reins ou in vitro. L'ADNg a été utilisé afin de faciliter la comparaison entre les différentes lames puisque qu'il devenait un standard équivalent sur chacune des lames (normalisation plus uniforme) (Talaat et al., 2002). Les deux sondes, qui allaient être hybridées sur la même lame, ont été combinées dans un même tube et 40 µl de tampon d'hybridation (Hyb 2X: 500 µl de formamide; 500 µl de SSC 20X et 20 µl de SDS 10% gardé à 37°C) était ajouté à ce tube. Suite à une dénaturation dans de l'eau bouillante pendant 5 minutes, le tube était centrifugé rapidement, le 80 µl résultant était finalement déposé sur la lame à la limite entre cette dernière et la lamelle (pénétration du liquide par capillarité sous la lamelle). La chambre était refermée, recouverte de papier d'aluminium pour éviter tout contact avec la lumière et incubée dans un bain à 42°C pendant au moins 16 heures.

2.5.3 Lavage des lames

Les lames étaient lavées (chacune séparément), avec faible agitation, pendant 5 minutes dans du SSC 2X additionné de 0,1 % de SDS (préchauffé à 42°C la veille) et pendant 10 minutes avec faible agitation dans du SSC 0,1X additionné de 0,1% de SDS. Ensuite, quatre différents trempages de 1 minute dans des contenants de SSC 0,1X ont été effectués. Les lames sont ensuite rincées rapidement dans de l'eau stérile puis rapidement dans de l'éthanol 95% et finalement centrifugées pour 5 minutes dans des tubes coniques de 50 ml à 4 000 X g (Beckman model TJ-6 Centrifuge).

2.5.4 Scanographie des lames et analyses statistiques

Une image fluorescente des lames a été numérisée à l'Institut de Recherche en Biotechnologie (IRB) à l'aide du Perkin Elmer Scan Array Lite Microarray selon le protocole du manufacturier. Pour quantifier l'intensité des spots de chaque lame, le logiciel QuantArray 3.0 a été utilisé. Une correction du bruit de fond a été effectuée en soustrayant l'intensité du bruit de fond de l'intensité brute de chaque point. Une normalisation de l'intensité totale a été effectuée, puis les ratios Cy5/Cy3 (ADNc/ADNg) ont été calculés pour l'ensemble des neuf lames. Par la suite, une ANOVA de valeur P < 0,001, avec une correction de Bonferroni, a été effectuée à l'aide du logiciel Tigr MeV 2.2 en utilisant les log2 des ratios précédemment calculés. Les résultats significatifs du test ANOVA qui avaient une valeur P plus petite que 0,001 et un log2 ratio vessies/in vitro ou reins/in vitro plus grand que 1 étaient considérés comme étant des gènes induits tandis que les log2 ratios plus petit que -1 étaient considérés comme des gènes réprimés. Ces intervalles correspondaient à des différences d'expression de plus ou moins 2 (Moreau et al., 2003).

Préalablement à l'hybridation de ces neufs lames, une expérience d'hybridation génomique comparative (CGH/comparative genomic hybridization) a été effectuée. Cette expérience a permis de comparer l'ADN génomique de la souche *E. coli* K-12 MG1655 et *E. coli* CFT073 sur une même lame. Il était alors possible de vérifier la présence et

l'absence des gènes de la souche *E. coli* CFT073 chez *E. coli* K-12 et de comparer les résultats obtenus avec la littérature. Les résultats permettaient de vérifier que l'hybridation se faisait de façon adéquate (Welch *et al.*, 2002; Porwollik *et al.*, 2004).

2.6 qRT-PCR

2.6.1 Préparation des échantillons

Pour marquer l'ADNc complémentaire de la 3^e ronde de SCOTS, la trousse *DyNAmoTM HS SYBR Green qPCR* (*New England BioLabs*) fut utilisée. Pour chaque réaction, 1 µl d'ADNc (vessies, reins ou in vitro), ou encore 1 µl d'eau pour les contrôles négatifs, était sujet à une amplification par PCR dans un volume final de 25 µl qui contenait 9,5 µl d'eau; 12,5 µl de *SYBR Green* (*2X Master Mix*); 1 µl d'amorces sens à 25 nM/ml (voir tableau 2.2) et 1 µl d'amorces antisens à 25 nM/ml (voir tableau 2.2). L'appareil utilisé fut le *Rotor-Gene RG-3000* de la compagnie *Corbett Research* avec un rotor de 36 puits selon les indications du manufacturier.

Toutes les réactions subissaient une étape de dénaturation à 95°C pendant 15 minutes suivi de 45 cycles de 20 secondes à 95°C, de 20 secondes à 60°C (à 55°C dans le cas des amorces 16S) et de 20 secondes à 72°C. Les produits de qRT-PCR ont ensuite été dénaturés par la chaleur tel que décrit dans le *Rotor-Gene 5 Software Manual* afin de s'assurer de la spécificité des produits amplifiés. Cette étape de dénaturation s'effectuait à la fin des 45 cycles en faisant passer la température des échantillons de 65°C à 99°C à raison de 0,2°C/sec (augmentation linéaire). L'appareil enregistrait alors la fluorescence de chaque échantillon tout au long de cette dénaturation.

Tableau 2.2 Gènes étudiés et amorces associées qui ont été utilisées lors de l'expérience de qRT-PCR.

Nom de l'amorce	Séquence	Référence
16S_F	5'-TGCAAGTCGAACGGTAACAG-3'	(Leverton et Kaper, 2005)
16S_R	5'-AGTTATCCCCCTCCATCAGG-3'	(Leverton et Kaper, 2005)
udp_F	5'-AATGGAATCTGCAACCCTGCTGAC-3'	Cette étude
udp_R	5'-TCTCAGCATTCGGGATCTCTTGCT-3'	Cette étude
fepC_F	5'-TCGTTACGCCAGCCATTTGATTGC-3'	Cette étude
fepC_R	5'-GCAGACCATAAATGCGCTCGATCA-3'	Cette étude
clpP_F	5'-CCAGGCGACCGATATCGAAATTCA-3'	Cette étude
clpP_R	5'-AATGATTGACCCGTATGAAGCGCC-3'	Cette étude
dps_F	5'-AAGTTACCCGCTGGACATCCACAA-3'	Cette étude
dps_R	5'-CTTTCGCTTCGTCAATCGCTTTGC-3'	Cette étude

2.6.2 Analyse des résultats

Tout comme pour les micropuces à ADN, les \log_2 des ratios vessies/LB et reins/LB ont été calculés. Pour calculer les ratios, une formule retrouvée dans l'article de Schmittgen et al. (2000) a été utilisée. Le logiciel présentait les résultats de qRT-PCR en faisant concorder le signal de fluorescence (ΔR_n) et le nombre de cycle. Le ΔR_n (= (R_n^+) – (R_n^-)) représente le signal de fluorescence du produit à n'importe quel temps (R_n^+) moins le signal de fluorescence basal (R_n^-) lors des premiers cycles, en d'autres termes, c'est l'amplification du signal. Un seuil arbitraire (dans notre cas de 0,05) de signal de fluorescence était ensuite établi. Lorsque la courbe ΔR_n dépassait ce seuil, la valeur C_t (nombre de cycle où le ΔR_n dépasse le seuil établi) était définie. C'était cette dernière valeur qui permettait de calculer les ratios à l'aide de la formule suivante :

Ratio =
$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

où $\Delta\Delta C_t = (C_t$ gène étudié dans un organe – C_t gène contrôle 16S dans un organe) – $(C_t$ gène étudié in vitro – C_t gène contrôle 16S in vitro). Ensuite, les \log_2 des ratios obtenus pouvaient être calculés afin de les comparer aux \log_2 des ratios des biopuces à ADN.





3.1 Infection du tractus urinaire des souris

Il était important d'établir le nombre de bactéries contenu dans la culture de départ afin de pouvoir comparer le nombre de bactéries injectées (input) et le nombre de bactéries récoltées (output) suite à l'infection. Comme mentionné précédemment, 10 µl des dilutions 10^{-6} à 10^{-9} (donc dilutions sur les pétris allant de 10^{-8} à 10^{-11}) ont été déposés en duplicata sur des géloses-sang (tableau 3.1). Il a ainsi été possible d'établir qu'un nombre approximatif de 2,9 x 10^{11} UFC/ml avait été inoculées à chaque souris.

Tableau 3.1 Comptage bactérien de l'inoculum de départ.

Dilution	Nombre de colonies (série 1)	UFC/ml (série 1)	Nombre de colonies (série 2)	UFC/ml (série 2)
10 ⁻⁸	TNC		TNC	
10 ⁻⁹	TNC		TNC	
10 ⁻¹⁰	36	$3,6 \times 10^{11}$	21	2.1×10^{11}
10 ⁻¹¹	1		3	

Moyenne: $\sim 2.9 \times 10^{11} \text{ UFC/ml}$

UFC, unités formatrices de colonies; TNC, trop nombreux pour être comptés (nombre de colonies); ml, millilitres

Une autre donnée importante était le poids de chaque souris puisque cette donnée permettait d'établir le volume d'anesthésiant à donner à chacune des souris, dans un premier temps, et le temps d'injection de l'inoculum de départ dans un deuxième temps (tableau 3.2). La moyenne des poids des souris, se situant autour de 19 grammes (g), a permis d'inoculer chaque souris avec au moins 1 x 10⁹ UFC/g. Ce nombre de bactéries permettait d'augmenter les chances de colonisation des reins et de la vessie (Hopkins *et al.*, 1995; Johnson et Brown, 1996).

Les contrôles d'urine pré- et post-inoculation des bactéries n'ont révélé aucune infection préalable ou subséquente originant d'une autre souche microbienne chez les souris. Tous les contrôles de stérilité, avant le prélèvement des reins, ont été négatifs (résultats non présentés).

Tableau 3.2 Détermination du nombre de bactéries inoculées à partir des données sur l'injection de l'inoculum de départ.

# Souris	Poids (g)	Volume anesthésie (ml)	Temps d'inoculation (sec)	Volume inoculé (μl)	Nombre de bactéries inoculées (UFC)
1	19,8	0,25	48	19,8	5,74 x 10 ⁹
2	19,9	0,25	48	19,9	$5,77 \times 10^9$
3	20,2	0,25	48	20,2	$5,86 \times 10^9$
4	18,4	0,23	44	18,4	$5,34 \times 10^9$
5	18,2	0,23	44	18,2	5,31 x 10 ⁹
6	18,3	0,23	44	18,3	5,31 x 10 ⁹
7	19,8	0,25	48	19,8	$5,74 \times 10^9$
8	17,4	0,22	42	17,4	5,05 x 10 ⁹
9	19,9	0,25	48	19,9	$5,77 \times 10^9$
10	18,9	0,24	45	18,9	$5,48 \times 10^9$

g, grammes; ml, millilitres; sec, secondes; µl, microlitres; UFC, unités formatrices de colonies Rappel: Le taux d'anesthésiant à injecter était de 0,0125 ml/g de souris et le taux d'injection de la pompe Harvard était de 1 µl/g et de 1 µl/2,4 sec. Le temps d'inoculation et le volume inoculé sont des données se rapportant à l'inoculum de départ.

Une fois tous les comptes bactériens effectués, suite aux prélèvements des organes d'intérêt, les cinq souris ayant des organes présentant les colonisations bactériennes parmi les plus importantes ont été choisies (cinq souris pour la vessie et cinq souris pour les reins). Dans le cas des vessies, ce sont les souris #1, 2, 3, 4 et 9 qui ont été choisies tandis que pour les reins, ce sont les souris #2 (rein droit), #4 (rein droit), #7 (rein gauche), #9 (rein droit et gauche) qui ont été choisies (tableau 3.3). Les organes ciblés présentaient une colonisation bactérienne se situant entre 4 x 10⁴ et 6 x 10⁶ UFC/g d'organe.

Tableau 3.3 Comptes bactériens suite à l'infection du tractus urinaire de 10 souris par la bactérie E. coli CFT073.

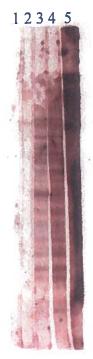
# Souris	1	2	3	4	S	9	7	∞	6	10
Vessie										
poids (g)	0,0062	0,0083	0,0080	0,0062	0,0063	0,0028	0,0085	0,0078	0,0093	9900,0
nb colonies (10 µl)	9	S	285	171	-	0	108	7	578	0
nb colonies (100 µl)	26	93	2252	1020	12	0	916	24	TNC	0
UFC/g	9,03 x 10 ⁴	$1,12 \times 10^5$	$3,56 \times 10^6$	$2,76 \times 10^6$	$1,90 \times 10^4$	0	1,27 x 10 ⁶	$3,08 \times 10^4$	6,22 x 10 ⁶	0
Rein droit										
poids (g)	0,0674	0,0523	0,0712	0,0611	0,0523	0,0553	0,0492	0,0571	0,0617	0,0506
nb colonies (10 µl)	т	52	30	20	0	0	5	0	45	0
nb colonies (100 µl)	47	544	268	263	0	0	44	0	488	0
UFC/g	$6,97 \times 10^3$	9,94 x 10 ⁴	$3,76 \times 10^4$	$4,30 \times 10^4$	0	0	$8,94 \times 10^3$	0	7,29 x 10 ⁴	0
Rein gauche										
poids (g)	0,0645	0,0685	0,0560	0,0515	0,0625	0,0402	0,0647	0,0530	0,0712	0,0689
nb colonies (10 µl)	0	0	0	-		7	99	0	92	0
nb colonies (100 µl)	0	0	0	22	0	80	513	0	916	0
UFC/g	0	0	0	$4,27 \times 10^3$	0	$1,99 \times 10^4$	$1,02 \times 10^5$	0	$1,29 \times 10^5$	0
		,								

g, grammes; nb, nombre; µl, microlitres; UFC, unité formatrice de colonies Les valeurs de poids correspondent à la moitié (approximativement) de l'organe puisque l'autre moitié a été conservée dans du TRIzol et dans l'azote liquide afin d'en extraire l'ARN. Les données en gras représentent les cinq échantillons choisis à cause des valeurs de UFC/g les plus élevés. Ce sont ces derniers qui ont été utilisés pour l'isolement de l'ARN et la capture par SCOTS.

3.2 SCOTS

L'ARN total a été extrait des organes choisis, puis a été converti en ADNc. L'ADNc bactérien a été capturé suite à trois rondes de SCOTS tel qu'expliqué dans la section 2.4. Les produits SCOTS obtenus ont été vérifiés par hybridation Southern. Les sondes utilisées constituaient les ADNc provenant des différentes rondes de SCOTS et la cible de ces sondes était l'ADNg de la souche *E. coli* CFT073. Cette étape de l'expérience permettait de vérifier si les sondes SCOTS présentaient une grande diversité de produits d'hybridation, ce qui confirmerait l'augmentation de la diversité avec les étapes successives de SCOTS. Les résultats obtenus dans les trois cas (vessies, reins et in vitro) furent très semblables et appropriés à ce qu'il était attendu. La figure 3.1 présente les résultats obtenus pour les vessies comme exemple. On voit clairement l'augmentation de la complexité du mélange d'ADNc avec les rondes de SCOTS successives.

Figure 3.1 Hybridation Southern de l'ADNg d'E. coli CFT073 avec des sondes correspondant à l'ADNc des différentes rondes de SCOTS provenant des vessies.



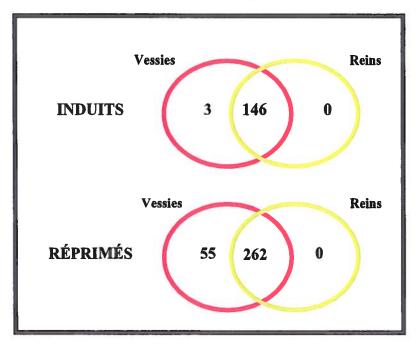
- 1) ADNc initial
- 2) ronde #1 de SCOTS
- 3) ronde #2 de SCOTS
- 4) ronde #3 de SCOTS
- 5) ADNr

Temps d'exposition de 10 minutes.

3.3 Biopuces à ADN

Les transcrits obtenus suite à la capture par la technique de SCOTS ont été utilisés comme sondes pour l'hybridation de biopuces. Les résultats présentés (et la discussion qui suit) font référence aux données ayant eu un résultat statistiquement significatif suite au test ANOVA (valeur P < 0,001) avec une correction de Bonferroni. Sur les 3189 gènes communs aux deux génomes (E. coli K-12 MG1655 et E. coli CFT073), 466 profils d'expression de gènes ont été considérés comme significatifs par le test ANOVA, ce qui représente 15% de l'ensemble des gènes totaux partagés par ces souches. Les analyses statistiques des résultats des biopuces ont démontré une plus grande proportion de gènes réprimés que de gènes induits dans les deux organes.

Figure 3.2 Diagramme de Venn illustrant le nombre de gènes induits ou réprimés dans les différents tissus.



De plus, il n'a pas été possible de cibler des gènes induits ou réprimés seulement dans les reins contrairement aux vessies (voir figure 3.2).

La figure 3.2 illustre très clairement que la majorité des gènes sont également induits ou réprimés dans les deux organes. Ce qui avance l'hypothèse qu'il ne devrait donc pas avoir une très grande différence dans l'expression des gènes dans les vessies par rapport aux reins. L'analyse des corrélations existantes (à 98%) entre les log₂ des ratios vessies/in vitro et des reins/in vitro (voir figure 3.3) est venue confirmer ce que laissait transparaître la figure 3.2.

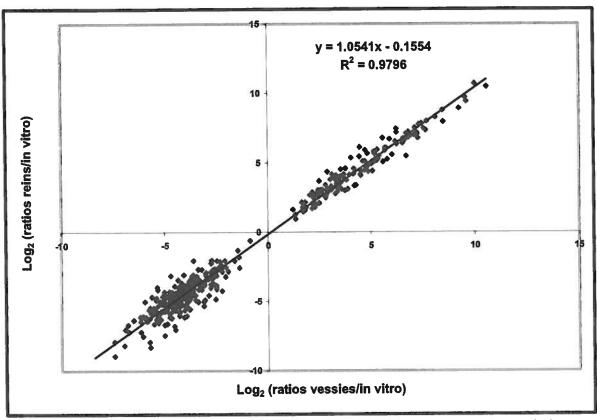


Figure 3.3 Illustration de la corrélation entre le log₂ des ratios vessies/in vitro et le log₂ des ratios reins/in vitro.

Comme les résultats des vessies et des reins sont très semblables, il fallait vérifier qu'il subsistait malgré tout, des différences avec la culture in vitro puisque toute l'analyse reposait sur la comparaison avec cette dernière. La figure 3.4 démontre, en effet, que lorsque l'on compare les données des vessies par rapport aux données in vitro (ou LB) ou encore les données des reins par rapport aux données in vitro, qu'il n'y a pratiquement pas de similarité entre ces profils d'expression (organes vs in vitro) (-0,43% et -0,47% de corrélation). Cette même figure vient, toutefois, renforcer les résultats démontrés dans la

figure 3.3 quant à la grande similitude dans l'expression des gènes dans les deux types d'organes.

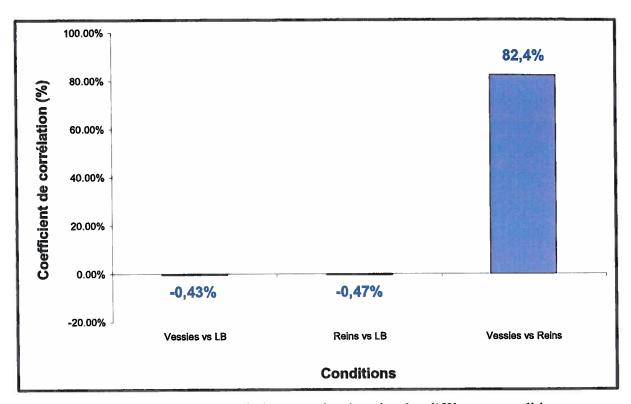
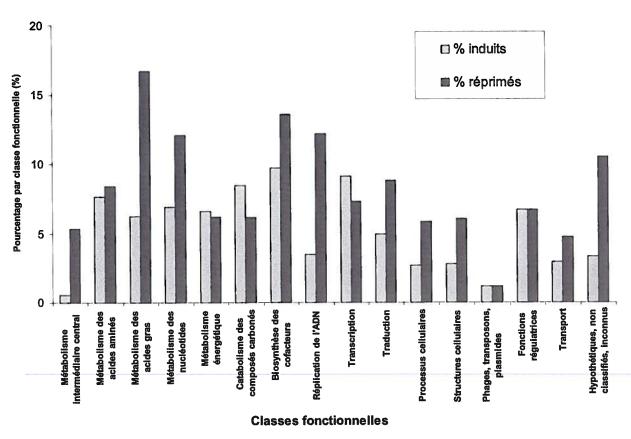


Figure 3.4 Coefficient de corrélation entre les données des différentes conditions.

Une fois que les différences et les similitudes d'expression entre les différents organes ont été constatées, une analyse plus poussée des 466 gènes significatifs a été effectuée. Pour commencer, les différentes classes fonctionnelles ciblées par l'analyse statistique ont été observées (figure 3.5). Les gènes aux fonctions hypothétiques (non classifiées et inconnues) sont en plus grande proportion (parmis les 466 gènes significatifs). En fait, ils constituent un peu moins de la moitié des données significatives obtenues (48%). Ensuite, les classes fonctionnelles les plus représentées sont celles du métabolisme énergétique (7%); de la traduction (5%), de la biosynthèse des cofacteurs (5%), de la biosynthèse et du métabolisme des acides aminés (5%) et du transport des petites molécules (4%).

Figure 3.5 Les classes fonctionnelles les plus représentées au niveau de la vessie et des reins lors de l'infection du tractus urinaire de la souris.



Les données correspondent au pourcentage des gènes de chaque classe fonctionnelle présents sur la lame d'E. coli K-12 MG1655.

Les gènes significatifs retrouvés dans ces différentes classes fonctionnelles ont été analysés afin de rechercher des patrons d'expression au niveau de certaines voies métaboliques. Afin d'alléger la discussion qui s'en suivra, seules les données les plus marquantes et intéressantes sont présentées dans les tableaux 3.4 et 3.5. C'est au niveau du métabolisme énergétique qu'il est possible d'observer une plus grande concordance au niveau de l'expression des différents gènes.

Tableau 3.4 Exemples de gènes induits in vivo lors de l'infection du tractus urinaire chez la souris.

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio ^a reins/LB
Biosynthè	se et métabolisme des acides aminés		
glnG	Régulateur de réponse pour gln (senseur glnL) (régulateur d'azote I, NRI)	7.548	7.478
lysC	Aspartokinase III, lysine sensible	8.110	8.293
Biosynthè	se et métabolisme des nucléotides		
carA	Carbamoyl-phosphate synthétase, sous-unité glutamine	7.705	7.995
udp	Uridine phosphorylase	10.577	10.491
Métabolis	me énergétique		
adhE	Alcool déshydrogénase, acétaldéhyde déshydrogénase, pyruvate formate-lyase désactivase	4.707	4.444
dsbE	Disulfide oxydoréductase (biogenèse du cytochrome c)	6.087	b
hypD	Joue un rôle structural dans la maturation des 3 hydrogénases	4.158	4.186
hypE	Joue un rôle structural dans la maturation des 3 hydrogénases	7.455	7.831
hybA	Petite sous-unité de l'hydrogénase-2	6.570	6.751
nrfF	Composante du complexe de nitrite réductase formate-dépendente	8.461	8.788
nrfG	Composante du complexe de nitrite réductase formate-dépendente	4.730	5.097
ttdB	Sous-unité B de la L-tartrate déshydratase	7.330	7.762
Catabolis	me des composés carbonés		
uxaB	Altronate oxydoréductase	9.550	9.706
Biosynthè	se des cofacteurs		
bioB	Biotine synthase	2.494	2.065
bioD	Déthiobiotine synthétase	6.831	6.818
bioF	8-amino-7-oxononanoate synthase	7.651	7.356
Transpor	t .		
exuT	Transport des hexuronates	6.183	6.526
fepC	Composante du transport de l'entérobactine liant l'ATP	6.820	7.206
Hypothéti	que, non classifié, inconnu		
yhhY	Protéine hypothétique	10.001	10.709

^a Le log₂ratio réfère à la croissance in vivo relativement à la croissance in vitro (LB).
^b Signal sous le seuil de détection.

La totalité des gènes induits sont présentés dans le tableau 5.1 de l'annexe I.

Valeur P < 0.001

Tableau 3.5 Exemples de gènes réprimés in vivo lors de l'infection du tractus urinaire chez la souris.

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio ^a reins/LB
Biosynthè	se et métabolisme des acides aminés		
asd	Aspartate-semialdéhyde déshydrogénase	-3.104	-3.849
dapE	N-succinyl-diaminopimélate déacylase	-5.137	-4.649
dapF	Diaminopimélate épimérase	-4.969	-5.157
glnA	Glutamine synthétase	-4.742	-3.147
glnD	Uridylyltransférase/dé-uridylylation de la protéine PII	-2.680	-3.322
Biosynthè	se et métabolisme des acides gras		
fabA	β-hydroxyacyl-ACP déshydratase, trans-2-décénoyl-ACP-isomérase	-3.339	-3.446
fabB	3-oxoacyl-[protéine porteuse d'acyl (ACP)] synthase I	-5.759	-6.221
Métabolis	sme énergétique		
cyoA	Sous-unité II du cytochrome o ubiquinol oxydase	-5.332	-6.537
cyoB	Sous-unité I du cytochrome o ubiquinol oxydase	-6.178	-6.198
cyoC	Sous-unité III du cytochrome o ubiquinol oxydase	-2.796	-3.780
fdoH	Sous-unité β de la formate déshydrogénase-O	-4.761	-5.149
fdoI	Sous-unité γ de la formate déshydrogénase-O	-4.383	-3.451
mdh	Malate déshydrogénase	-5.877	b
nuoC	Sous-unité du fragment connecteur de la NADH déshydrogénase I	-5.043	-5.190
nuoG	Sous-unité du fragment soluble de la NADH déshydrogénase I	-3.652	b
sdhA	Sous-unité de flavoprotéine de la succinate déshydrogénase	-3.882	-4.160
sdhD	Sous-unité hydrophobe de la succinate déshydrogénase	-5.266	-5.869
Processus	cellulaires		
betA	Flavoprotéine, choline déshydrogénase	-4.837	b
osmC	Peroxydase inductible en condition d'hyperosmolarité	-5.311	^b
osmY	Protéine périplasmique inductible en condition d'hyperosmolarité	-7.154	b
Fonctions	s régulatrices/dégradation des protéines		
clpP	Sous-unité protéolytique de la sérine protéase clpA-clpP ATP- dépendante	-6.983	-8.167
dps	Régulateur global, conditions de privation	-7.455	-8.930
fnr	Régulateur transcriptionnel en aérobie, de la respiration anaérobique, de la balance osmotique	-8.408	b

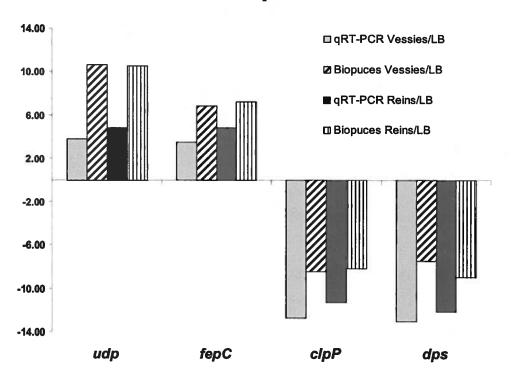
^a Le \log_2 ratio réfère à la croissance in vivo relativement à la croissance in vitro (LB). ^b Signal sous le seuil de détection. Valeur P < 0,001

La totalité des gènes induits sont présentés dans le tableau 5.2 de l'annexe I.

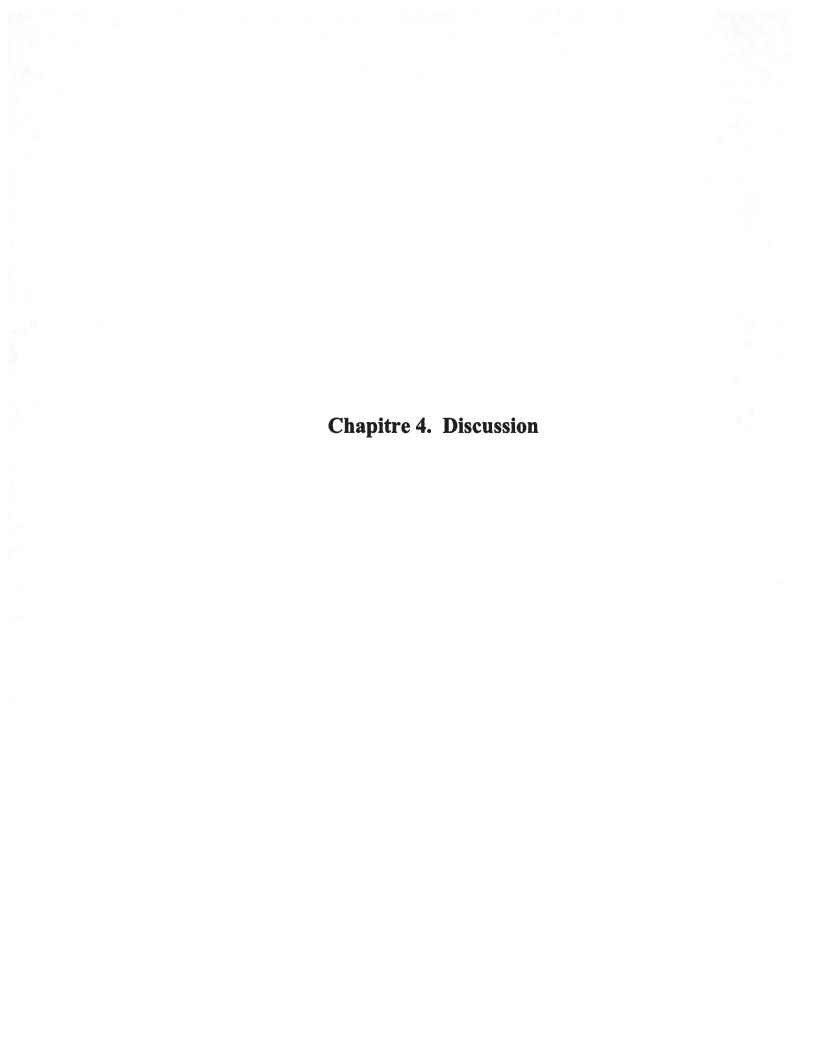
3.4 qRT-PCR

Afin de s'assurer de l'exactitude des résultats des biopuces, quelques gènes significatifs ont été vérifiés par qRT-PCR. C'est l'ADNc de la 3^e ronde de SCOTS qui a été utilisée afin de vérifier quelques données obtenues lors de l'expérience des biopuces à ADN. Les gènes ciblés par cette vérification ont été choisis de façon aléatoire parmi les 471 gènes significatifs. Deux de ces gènes font partie des gènes les plus induits (*udp* et *fepC*) et les deux autres font partie des gènes les plus réprimés (*clpP* et *dps*). Les amorces utilisées pour amplifier le gène contrôle provenaient de l'expérience de Leverton et Kaper (2005). Ces amorces permettaient l'amplification de l'opéron *rrsB* de l'ARN ribosomal 16S chez une souche EPEC de *E. coli* étant donné son expression continuelle et stable dans la cellule.

Figure 3.6 Comparaison des résultats du qRT-PCR par rapport aux résultats des biopuces.



Les valeurs présentées font référence aux \log_2 des ratios organe/LB. Toutes les réactions de qRT-PCR ont été effectuées en triplicata sauf dans le cas des gènes clpP et dps qui sont en duplicata à cause d'un manque d'ADNc de la 3^e ronde de SCOTS (pour les reins seulement).



4.1 Infection du tractus urinaire des souris

Un modèle d'infection de souris a été utilisé afin d'étudier l'expression des gènes conservés chez une souche UPEC lors d'infection du tractus urinaire. Le nombre de bactéries inoculées fut élevé afin de s'assurer qu'il y ait établissement d'une infection au niveau du tractus urinaire. Le poids des souris étaient assez réguliers (moyenne de 19 g), ce qui a permis des volumes d'inoculation quasi semblables d'une souris à l'autre. Tous les contrôles de stérilité avant infection (urine) nous ont assuré que les souris n'étaient pas infectées préalablement à l'inoculation des bactéries. Les contrôles post-infection servaient à nous assurer que les souris n'avaient pas été infectées pendant l'infection par d'autres bactéries que la souche *E. coli* CFT073. Les organes étaient choisis selon les taux d'infection les plus élevés chez ceux-ci indépendamment de la souris (tableau 3.3). Du tiers à la moitié du nombre initial de bactéries a été récupéré de la vessie ou des reins de chaque souris infectée. L'infection s'est donc effectuée dans une assez bonne proportion. Les bons rendements obtenus suite à l'utilisation d'une lignée de souris telle que celle des CBA/J avaient été soulevées préalablement (Gunther *et al.*, 2002; Snyder *et al.*, 2004).

4.2 SCOTS

Dans le but de capturer les gènes bactériens exprimés chez la souris pendant une ITU, la technique de SCOTS a été utilisée. Suite à une infection de 48 heures, les organes ont été récoltés, puis l'ARN total a été extrait afin d'être converti en ADNc. L'ADNc des différents organes ont subi trois rondes de SCOTS. L'hybridation Southern a permis la vérification de la diversité des produits obtenus suite aux différentes rondes de SCOTS. C'est une observation qualitative des patrons obtenus sur les membranes de nylon qui nous a permis d'effectuer cette vérification. Étant donné que les sondes utilisées ciblaient l'ensemble des produits SCOTS, ce n'était pas une simple bande qui était recherchée, mais plutôt plusieurs produits d'hydridation. De plus, les produits d'hybridation devaient devenir de plus en plus diversifiés avec l'augmentation des rondes de SCOTS puisque la complexité de la population d'ADNc bactérien devenait plus importante (la capture éliminait de plus en plus les transcrits eucaryotes et ribosomaux). C'est ce qui a été

observé (figure 3.1). La bandelette de nylon marquée avec l'ADNr servait à des fins de comparaisons afin de vérifier la présence de transcrits ribosomaux dans les sondes SCOTS. Les bandes plus foncées (bandelette #5 de la figure 3.1) représentent les sondes ribosomales et on remarque que ces bandes semblent être présentes sur les hybridations de l'ADNc provenant des 2^e et 3^e rondes de SCOTS. Ceci implique que quelques transcrits ribosomaux n'ont pas été complètement bloqués lors des rondes de SCOTS. Ceci est tout à fait plausible puisque la sonde ribosomale ne ciblait pas l'ensemble des gènes ribosomaux (voir section 2.1) (Daigle, Graham et Curtiss, 2001). Toutefois, la majorité de ces transcrits ont, tout de même, été éliminés dans la mesure du possible. Cette étape permettait surtout de vérifier les transcrits obtenus. À la lumière des résultats de la figure 3.1, il a été conclu que les transcrits correspondaient bien à la souche bactérienne étudiée (*E. coli* CFT073) et qu'ils semblaient bien représenter l'ensemble du génome de cette dernière.

4.3 Biopuces à ADN et confirmation par qRT-PCR

Pour identifier de façon globale les gènes bactériens exprimés chez la souris pendant une ITU, les produits SCOTS ont été utilisés comme sondes pour une analyse par biopuces. Une fois la vérification par hybridation Southern effectuée, les transcrits obtenus suite aux trois rondes de SCOTS ont été marqués afin d'hybrider des lames de biopuces. Les lames étaient simultanément hybridées avec l'ADNc marqué provenant d'une des conditions à l'étude (vessie, reins, in vitro) et l'ADNg marqué de la souche d'*E. coli* CFT073.

L'utilisation de l'ADNg comme référence a déjà fait ses preuves. En effet, la normalisation avec l'ADNg permet une meilleur reproductibilité des résultats et les résultats obtenus, lors de la comparaison avec la qRT-PCR, sont beaucoup plus concordants (90%) qu'une normalisation avec l'ARN (ou l'ADNc) d'une autre condition expérimentale. La normalisation génomique permet d'éliminer les problèmes communs suivant: inconsistance dans la déposition des puces sur les lames, biais au niveau de l'incorporation des fluorochromes, distribution inégale des échantillons lors de

l'hybridation, temps d'exposition différents pour chaque hybridation. De plus, ce type de normalisation, élimine le besoin d'effectuer des expériences de changement de fluorochrome (*flip dye*) pour les divers échantillons qui présentent bien souvent beaucoup de variabilité dans les résultats. Comme l'ADNg se retrouve de façon plus uniforme que l'ARN et qu'il représente une forme relativement stable de l'information génétique, son utilisation peut faciliter la comparaison de l'expression génique entre différents groupes expérimentaux (Talaat *et al.*, 2002; Hinton *et al.*, 2004).

Plusieurs études sont à l'origine de l'hypothèse sur la participation des gènes conservés dans la virulence des pathogènes lors d'infections (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993; Russo et al., 1996b; Torres et al., 2001; Bahrani-Mougeot et al., 2002; Dozois, Daigle et Curtiss, 2003; Redford, Roesch et Welch, 2003; Roesch et al., 2003; Burall et al., 2004; Chang et al., 2004; Snyder et al., 2004; Lamarche et al., 2005; Li et al., 2005). Notre projet de recherche est venu confirmer cette hypothèse puisque plusieurs gènes conservés étaient induits lors de l'infection (tableau 3.4).

L'étude de Snyder *et al.* est celle qui se rapproche le plus de la nôtre d'un point de vue technique. Étant donnée qu'elle sera utilisée à titre de comparaison à quelques reprises au cours de cette discussion, un bref résumé de cette étude est présenté dans le paragraphe suivant.

Snyder et al. ont publié une étude sur l'analyse d'expression des gènes de la souche UPEC CFT073 (la souche qui fait aussi l'objet de la présente étude). L'expression différentielle des gènes de la souche CFT073 cultivée dans un bouillon de culture (in vitro) a été comparée à l'expression différentielle des gènes de la souche CFT073 cultivée dans de l'urine filtrée (in vitro) provenant de plusieurs femmes âgées de 20 à 40 ans sans antécédents d'ITU ou d'utilisation d'antibiotiques dans les deux derniers mois. Elle a également été comparée à des échantillons d'urine (in vivo) provenant de souris infectées par la même souche à l'aide du modèle d'infection ascendante du tractus urinaire (Hagberg et al., 1983). Pour ce faire, Snyder et al. ont utilisé des lames de biopuces d'oligonucléotides de la souche CFT073 contenant ses 5 611 cadres de lecture ouverts

(NimbleGen Systems Inc). Ils ont trouvé 313 gènes induits et 207 gènes réprimés dans les échantillons in vivo (valeur P de 0,05). Afin d'analyser les gènes spécifiques à la souche CFT073 qui pourraient avoir un rôle majeur dans les ITU, ils ont éliminé tous les gènes communs avec la souche de laboratoire E. coli K-12. Ils ont ainsi pu cibler 45 gènes absents de la souche K-12, dont 25 d'entre eux avaient été préalablement identifiés comme gènes de virulence. Des 313 gènes induits (incluant ceux présents chez E. coli K-12), 41 gènes codaient pour des protéines hypothétiques. La comparaison de l'expression des gènes in vitro et in vivo a permis à ce groupe de chercheurs de conclure que les facteurs métaboliques et de virulence étaient beaucoup plus induits lors de conditions in vivo et qu'ils étaient traduits rapidement (donc croissance rapide des bactéries) puisque 35 des 50 gènes les plus induits codaient pour la machinerie traductionnelle. Les autres gènes induits étaient les fimbriae de type 1, les systèmes d'acquisition du fer, les gènes responsables de la synthèse des LPS et des polysaccharides capsulaires, les gènes de résistance aux drogues et les gènes qui permettaient la sécrétion de microcine. Les gènes les plus induits dans le cas des bactéries provenant de l'urine humaine appartenaient aux systèmes d'acquisition du fer, de la capsule et de la sécrétion de microcine. Ce qui laissait sous-entendre que la croissance dans l'urine humaine permettait de mimer la croissance in vivo (Snyder et al., 2004). Cette expérience est venue apporter beaucoup d'information sur l'expression des gènes in vivo. Par contre, l'utilisation du terme in vivo accordé à des échantillons d'urine peut sembler quelque peu contradictoire étant donné qu'une ITU est plutôt considérée comme une colonisation de la vessie et/ou des reins. De plus, il devient difficile d'établir si les bactéries provenant de l'urine des souris avaient eu le temps de coloniser la vessie ou encore si elles avaient été lessivées n'ayant pu s'attacher à l'hôte (section 1.2.3). Il aurait fallu comparer ces données à des échantillons d'ARN provenant de la vessie et des reins afin d'évaluer si les gènes présentaient le même patron d'expression que les échantillons d'ARN provenant de l'urine de souris et humaine.

Lors du présent projet de recherche, l'expression différentielle des gènes de la souche d'*E. coli* CFT073 cultivée dans un bouillon de culture (in vitro) a été comparée à l'expression différentielle des gènes de la même souche dans la vessie et les reins suite à une infection du tractus urinaire de souris (in vivo). Pour ce faire, des biopuces contenant

les 4290 cadres de lecture ouverts de la souche *E. coli* K-12 MG1655 (*Gene Expression Center/University f Wisconsin*) ont été utilisées. Parmi les 3189 gènes communs aux deux souches (*E. coli* CFT073 et *E. coli* K-12 MG1655), les différences d'expression de 466 gènes (15%) sont considérés comme significatifs suite aux analyses statistiques. L'analyse statistique a ciblé un plus grand nombre de gènes réprimés (317) que de gènes induits (149). Nous n'avons pas été en mesure de cibler des gènes induits ou réprimés seulement dans les reins (valeur *P* de 0,001) (figure 3.2). Il semblerait que l'expression des gènes conservés chez *E. coli* CFT073 dans la vessie et les reins ne soit pas vraiment différente suite à une infection de 48 heures dans le tractus urinaire des souris. Une des raisons pouvant expliquer cette absence de divergence serait dû au fait que la comparaison n'était limitée qu'aux gènes appartenant au métabolisme de base (gènes conservés chez l'ensemble des *E. coli*) et non à l'ensemble des gènes du génome d'*E. coli* CFT073 (gènes conservés et gènes pathospécifiques). De plus, l'absence de différence semble indiquer que l'environnement de la vessie et des reins est comparable.

Les gènes les plus induits codaient pour des produits appartenant aux classes fonctionnelles telles que la biosynthèse des cofacteurs, le catabolisme des composés carbonés et le métabolisme des acides aminés sans oublier les gènes aux fonctions putatives ou totalement inconnues.

L'analyse des résultats des biopuces qui suit cible davantage les gènes étudiés qui ont fait l'objet d'études publiées ou encore dont l'induction ou la répression est significative et capte davantage l'attention. Étant donné le nombre élevé d'informations obtenus, seuls les résultats des tableaux 3.4 et 3.5, classés selon les différentes classes fonctionelles, sont discutés afin d'alléger le texte. La totalité des résultats significatifs (induits et réprimés) sont présentés dans les tableaux de l'annexe I. De plus, nos données sont, à plusieurs reprises, comparées aux données publiées par Snyder et al. (2004), mais également aux autres études démontrant l'expression de gènes conservés. Toutefois, il faut garder en tête que la présente analyse est basée sur l'expression des gènes communs à la souche E. coli K-12 (donc pas les gènes de virulence) contrairement à l'article de Snyder et al. qui discute autant des gènes de virulence que des gènes conservés.

Biosynthèse et métabolisme des acides aminés. Les résultats de biopuces obtenus démontrent une induction du gène glnG et une répression des gènes glnA et glnD (tableaux 3.4 et 3.5). L'induction du régulateur de réponse de la glutamine, glnG, implique un manque d'azote pour la bactérie qui est normalement reflété par l'activation de la transcription de l'opéron qui synthétise la glutamine synthétase (opéron glnALG ou Ntr) (voir figure B1 de l'annexe B). L'azote est nécessaire à la synthèse des acides aminés qui constitue un processus complexe qui s'effectue en plusieurs étapes (Prescott, Harley et Klein, 1995). L'azote est un facteur limitant dans la vessie et les reins. En fait l'azote est présent en abondance dans l'urine à cause de l'urée. Toutefois, il devient une ressource limitée dans le tractus urinaire puisque E. coli ne possède pas l'uréase permettant d'hydrolyser l'urée en ammoniac et en CO₂ (Snyder et al., 2004). La glutamine est une source d'azote nécessaire à la synthèse des purines, des pyrimidines et de divers acides aminés. L'augmentation du taux de glutamine synthétase (produit du gène glnA) permet à la bactérie d'utiliser les faibles concentrations d'ammoniac disponibles et de produire des histidinases et des nitrogénases qui permettront l'obtention de l'azote manquant à partir de sources organiques ou de l'azote atmosphérique (N2). Pour que cette cascade d'événements ait lieu, il faut l'activation du régulateur glnG (Nr_I/nitrogen regulator I) (voir figure B1 de l'annexe B) (Stock, Ninfa et Stock, 1989). La glutamine synthétase (glnA) est donc régulée négativement par la quantité de glutamine. Lorsque les concentrations intracellulaire de glutamine sont élevées, il y a activation de la portion de dé-uridylylation de l'enzyme glnD (enzyme bifonctionnelle: uridylyltransférase et dé-uridylylation). La dé-uridylylation d'une protéine régulatrice PII va permettre l'interaction de cette dernière avec une adénylyltransférase qui va, à son tour, catalyser l'adénylation de la glutamine synthétase (= inactivation) (voir figure B1 de l'annexe B) (Neidhardt et Umbarger, 1996). Toutefois, nos résultats ne concordent pas tout à fait avec ce patron d'expression. Un manque d'azote devrait induire la synthèse de la glutamine synthétase. Les résultats obtenus corrèlent donc plus ou moins avec les données obtenues par Snyder et al. (2004) qui ont observé l'induction du gène glnA et des gènes glnP et glnQ (importateurs de glutamine).

Les gènes asd, dapE et dapF sont réprimés (tableau 3.5) tandis que le gène lysC est induit (tableau 3.4). La lysine ne semble pas être un facteur limitant pour les bactéries lors d'ITU. En effet, les gènes asd, dapE et dapF sont tous impliqués dans la voie de biosynthèse de la lysine et du peptidoglycane (voir figure B2 de l'annexe B). La première étape de la biosynthèse est catalysée par le gène lysC. Ces résultats sont tout à fait plausibles puisque la première étape de la biosynthèse de la lysine n'est pas seulement impliqué dans la biosynthèse de la lysine, mais également de trois autres acides aminés (Theze et al., 1974; Keseler et al., 2005). Il a été démontré que les gènes asd, dapE et dapF étaient des gènes essentiels chez E. coli K-12 MG1655 contrairement au gène lysC lorsque les bactéries étaient incubées dans un milieu riche en aérobie (Gerdes et al., 2003).

Biosynthèse et métabolisme des acides gras et des lipides. L'expression des gènes fabA (β-hydroxyacyl-ACP-déshydratase) et fabB (3-oxoacyl-ACP) synthase I), qui appartiennent au FAS II, est réprimée dans le tractus urinaire lors de l'infection des souris (tableau 3.5). Ces deux gènes sont impliqués dans l'élongation des chaînes insaturées (ou non saturés) d'acides gras (voir figure B3 de l'annexe B) (White et al., 2005). Les lipides sont formés d'acides gras qui sont constitués d'acides monocarboxyliques qui possèdent de longues chaînes alkylées. De façon générale, ces chaînes ont un nombre pair de carbones (Prescott, Harley et Klein, 1995). Chez les bactéries, les plantes et les parasites, on retrouve le système de synthèse II des acides gras (FAS II/fatty acid synthesis II) (White et al., 2005). Les bactéries anaérobiques et plusieurs bactéries aérobiques vont former des liaisons doubles lors de la synthèse des acides gras grâce à la déshydratation des acides gras hydroxylés. La synthèse des doubles liaisons de cette voie ne nécessite pas la présence d'oxygène (Prescott, Harley et Klein, 1995). Le gène fabA est responsable de la production d'acides gras non saturés ou saturés (deux embranchements distincts dans la voie métabolique) lorsque la chaîne carbonée est de dix carbones. Le gène fabB, quant à lui, catalyse une des étapes de la synthèse des acides gras non saturés. Le fait que ces deux gènes soient réprimés chez E. coli CFT073 dans le tractus urinaire suggère que la bactérie ne se retrouve pas dans une situation où il lui est nécessaire de produire des acides gras non saturés (autre article dans la littérature).

Biosynthèse et métabolisme des nucléotides. Les gènes udp et carA sont hautement induits dans les deux organes (tableau 3.4).

Le gène *udp* code pour l'uridine phosphorylase qui catalyse la phosphorylation réversible de l'uridine pour donner l'uracile et le ribose-1-phosphate (Oliva *et al.*, 2004). Les purines et les pyrimidines sont des bases azotées cycliques qui possèdent des doubles liaisons et des groupements aromatiques. La biosynthèse des purines et des pyrimidines est importante pour la synthèse de l'ATP (adénosine 5'-triphosphate), de cofacteurs, de l'ARN, de l'ADN et d'autres constituants cellulaires (Prescott, Harley et Klein, 1995). La phosphorylation des purines et des pyrimidines fait partie des réactions importantes dans les voies biochimiques impliquant des nucléotides et leurs précurseurs. Cette phosphorylation permet le clivage des purines et des pyrimidines au niveau du lien glycosidique carbone-azote par un phosphate afin de libérer la base et le ribose-1-phosphate. L'induction de ce gène dans la vessie et les reins (tableau 3.4) suggère une activité cellulaire résidant dans la bactérie afin qu'elle puisse croître et se multiplier pour continuer d'infecter l'hôte.

Le gène carA code pour l'une des sous-unités de la carbamoyl-phosphate synthétase qui est impliquée dans la biosynthèse de l'arginine et des pyrimidines (cytosine, thymine, uracile) (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993; Thoden et al., 2002). L'induction de ce gène dans notre expérience semble entrer en corrélation avec le fait que la disponibilité des pyrimidines (en plus de celles des purines, de l'histidine et des acides aminés aromatiques) soit limitée dans les tissus des souris (Fields et al., 1986). Cette faible disponibilité impliquerait donc pour la bactérie, la nécessité d'induire le gène carA afin de produire de l'arginine ou des pyrimidines par elle-même. Dans une expérience d'infection de souris par S. typhimurium, il avait été suggéré que l'opéron carAB était induit dans la rate à cause de la faible disponibilité de pyrimidines (Mahan, Slauch et Mekalanos, 1993). Le modèle d'infection du tractus urinaire chez la souris a été utilisé pour faire une analyse STM de la bactérie Proteus mirabilis. Le gène carA faisait parti des 25 mutants atténués identifiés (Burall et al., 2004).

Métabolisme énergétique. Le métabolisme énergétique du carbone lors de la respiration anaérobique et de la fermentation semble avoir une grande importance à l'intérieur de la vessie et des reins des souris lorsque infectés par *E. coli* CFT073. La respiration anaérobique implique l'oxydation de molécules (comme accepteur d'électrons) autre que l'oxygène afin de produire de l'énergie tandis que la fermentation est un processus où les molécules organiques agissent comme accepteur et donneur d'électrons (Prescott, Harley et Klein, 1995).

Plusieurs gènes, appartenant au métabolisme énergétique du carbone en condition anaérobique ou lors de la fermentation sont hautement induits dans les deux organes (tableau 3.4). Les gènes nrfF et nrfG sont induits lors d'ITU (tableau 3.4). Ces gènes codent pour une partie du complexe de nitrite réductase formate-dépendante (biosynthèse du cytochrome c) lors de la croissance en anaérobie (Grovc, Busby et Cole, 1996; Eaves c0 et c1, 1998). Le cytochrome c552 est un nitrite réductase et il a été le premier cytochrome reconnu pour son induction en anaérobie (Eaves c1, 1998). Les cytochromes sont des transporteurs d'électrons utilisant des atomes de fer (Prescott, Harley et Klein, 1995) et les gènes codant pour ceux-ci sont presque toujours induits en conditions anaérobiques ou lorsque l'oxygène se retrouve en quantité limitée (Iobbi-Nivol c1, 1994). Le gène c1 de c2 (induit; tableau 3.4) code pour une protéine de la membrane cytoplasmique nécessaire à la maturation du cytochrome c3 (Thony-Meyer c1, 1995). Ces deux gènes suggèrent un environnement avec une concentration faible en oxygène dans les deux organes étudiés.

Les gènes hypD et hypE sont induits dans les deux organes (tableau 3.4). Les gènes hypD et hypE jouent un rôle structural dans la maturation de trois hydrogénases. Les hydrogénases (il y en trois qui ont été identifiées) sont des enzymes catalysant l'oxydation réversible de l'hydrogène moléculaire (H₂) et ils sont exprimées en anaérobie (Jacobi, Rossmann et Bock, 1992; Sargent et al., 1998; Reissmann et al., 2003). Le gène hybA (induit; tableau 3.4) code pour une petite sous-unité de l'hydrogénase 2. Le gène ttdB (induit; tableau 3.4) code pour la sous-unité B de la L-tartrate déshydratase qui réduit

le tartrate en conditions anaérobiques (Reaney et al., 1993) et qui serait exprimé lors de la croissance exponentielle bactérienne (Nesin et al., 1987). Finalement, le gène adhE (induit; tableau 3.4) code pour une protéine fermentative trifonctionnelle: l'acétaldéhyde-alcool déshydrogénase. Ce gène est induit lorsque les oxydants alternatifs tels que le nitrate, l'oxyde triméthylamine ou encore le fumarate sont absents et ne peuvent être utilisés comme accepteur d'électrons en conditions anaérobiques. Dans ce cas, ce sont les sucres et leurs dérivés qui sont fementés en produits tels que l'acétate, le lactate, le succinate, le formate et l'éthanol (Leonardo, Cunningham et Clark, 1993; Membrillo-Hernandez et al., 2000). L'induction de ce gène semble corréler avec l'absence d'oxygène dans la vessie et les reins lors d'ITU. Tous ces gènes sont induits en conditions anaérobiques, ce qui suggère que les bactéries semblaient se retrouver dans cette condition 48 heures suite à l'infection ascendante du tractus urinaire des souris.

Les gènes cyoB, cyoA et cyoC sont les trois sous-unités (sous-unités I, II et III respectivement) du cytochrome o ubiquinol oxydase (Chepuri et al., 1990). Les résultats de biopuces (tableau 3.5) obtenus démontrent une répression importante de ces trois gènes. E. coli possède une chaîne respiratoire aérobique qui est composée de déshydrogénases (comme la succinate déshydrogénase) liées à la membrane cellulaire qui oxydent les substrats organiques dans la cellule et qui réduisent l'ubiquinone-8 en ubiquinol-8 à l'intérieur de la membrane cytoplasmique (Chepuri et al., 1990). L'ubiquinone ou coenzyme Q permet le transport d'électrons et de protons dans plusieurs chaînes respiratoires (Prescott, Harley et Klein, 1995). Le complexe du cytochrome o et du cytochrome d vont oxyder l'ubiquinol-8 suite à sa diffusion libre de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Le cytochrome o prédomine en condition où la quantité d'oxygène est élevée tandis que le cytochrome d en condition anaérobique.

Il est également possible d'observer la répression des gènes sdhA et sdhD (tableau 3.5) (sous-unité de flavoprotéine et hydrophobique de la succinate déshydrogénase respectivement). La succinate déshydrogénase est une enzyme exprimée en aérobie et réprimée en anaérobie (Ingledew et Poole, 1984; Cecchini et al., 2002). Sa répression est due à la liaison du régulateur de protéine ArcA au promoteur du gène sdhC (sous-unité

membranaire de la succinate déshydrogénase). Le régulateur ArcA est activé par ArcB (système de régulation à deux composantes) lorsque les cellules en croissance passent de conditions aérobiques à des conditions anaérobiques (Cecchini et al., 2002). Ces résultats semblent suggérer que les bactéries devaient se retrouver en anaérobie dans la vessie et dans les reins au moment de l'infection. Toutefois, ils sont différents des résultats de Snyder et al. puisque ces derniers ont observé une expression marquée des gènes cyoA et cyoB et qu'ils ont conclu que la croissance des bactéries se faisaient en aérobie dans le tractus urinaire (Snyder et al., 2004). Il ne faut pas oublier que leur expérience n'impliquait que l'urine récoltée ex vivo des souris et des femmes tandis que la nôtre ciblait plutôt les organes (reins et vessie) exempts d'urine, donc les bactéries qui colonisent les tissus ou cellules de ces organes. Nous parlons donc, à ce moment, de deux environnements très différents; ce qui pourraient expliquer les résultats divergents.

D'autres gènes tendent à confirmer l'environnement dans lequel se trouvait *E. coli* CFT073 au moment de l'infection. Le gène *mdh* qui code pour la malate déshydrogénase (catalyse l'interconversion du malate et de l'oxaloacétate dans le cycle tricarboxylique) était réprimé dans les deux organes (tableau 3.5). Une étude a démontré que l'expression de ce gène était plus importante en conditions aérobiques qu'anaérobiques (Park, Cotter et Gunsalus, 1995); ce qui suggère, encore une fois, des conditions anaérobiques à l'intérieur des deux organes lors d'ITU chez la souris.

Les gènes fdoH et fdoI sont réprimés (tableau 3.5). Les gènes fdoH et fdoI codent respectivement pour les sous-unités β et γ de la formate déshydrogénase-O (Abaibou et al., 1995). La formate déshydrogénase-O est formée par trois sous-unités (α , β et γ). La formate déshydrogénase-O est utilisée comme accepteur terminal d'électrons (alternativement à l'oxygène) afin de générer la force proton motrice et son expression est augmentée lorsque la cellule se retrouve en aérobiose. Un de ses rôles physiologiques est de permettre à la cellule de s'adapter rapidement aux conditions anaérobiques de façon indirecte étant donnée l'augmentation de son expression en aérobiose. Cette répression pourrait donc s'expliquer par une présence limitée d'oxygène dans ces deux organes.

Les gènes *nuoC* et *nuoG*, codant pour différentes sous-unités de la NADH déshydrogénase I, sont également réprimés dans les deux organes (tableau 3.5). La NADH déshydrogénase I fait partie de la chaîne de transport d'électrons et catalyse la conversion de l'ubiquinone-8 en ubiquinol-8. L'ubiquinone-8 est présente en grande quantité en condition d'aération élevée (Ingledew et Poole, 1984; Pruss *et al.*, 1994). La répression des gènes *nuoC* et *nuoG* pourrait s'expliquer par la présence de peu d'ubiquinone-8 due à la faible quantité d'oxygène présente telle que démontrée par l'expression des gènes mentionnés précédemment. Les différents résultats de biopuces obtenus suggèrent donc que l'environnement dans la vessie et les reins est anaérobique lors d'ITU chez la souris.

Transport et catabolisme des composés carbonés. L'induction des gènes uxaB et exuT (tableau 3.4) semblent indiquer une source de carbone présente dans le tractus urinaire qui peut être utilisée par les bactéries. Ces deux gènes sont impliqués dans la voie catabolique d'hexuronates telles que la D-glucuronate et la D-galacturonate. Le gène exuT code pour le système de transport du glucuronate et du galacturonate. Le gène uxaB code pour l'altronate oxydoréductase qui est impliquée dans le catabolisme du galacturonate (voir figure B4 et B5 de l'annexe B) (Portalier, Robert-Baudouy et Stoeber, 1980; Roos et al., 2006). Nos résultats corrèlent avec ceux de Snyder et al. (2004). Les hexuronates et les hexanates constituraient l'une des sources de carbone disponibles aux bactéries dans le tractus urinaire (Snyder et al., 2004), et ces derniers ne sembleraient pas limités au niveau de ces nutriments. Afin de comprendre les besoins en composés carbonés d'E. coli K-12 MG1655 dans l'intestin des mammifères, du mucus provenant du caecum de souris a été utilisé pour une analyse par biopuces de l'expression différentielle des gènes. Cette étude a permis d'identifier les gènes uxaB et exuT comme étant hautement induits et de conclure que le glucuronate faisait partie des composés impliqués dans la persistence et non l'initiation de la colonisation (Chang et al., 2004).

Biosynthèse des cofacteurs. Plusieurs gènes conservés, nécessaires à la croissance bactérienne, sont induits lors de l'infection du tractus urinaire des souris. Par exemple, trois gènes (bioB, bioD et bioF) (induits; tableau 3.4) sont impliqués dans l'une des quatre

étapes de la biosynthèse de la biotine (voir figure B5 de l'annexe B). La biotine possède plusieurs rôles: vitamine hydrosoluble, facteur de croissance, cofacteur ou encore coenzyme. Elle est impliquée dans plusieurs voies biochimiques telles que la carboxylation biotine-dépendante (réaction chimique convertissant les composés carbonés en biotine), la biosynthèse des acides gras, la gluconéogenèse (synthèse du glucose à partir de précurseurs non glucidiques) et le métabolisme de plusieurs acides aminés (Otsuka et al., 1988; Prescott, Harley et Klein, 1995; Streit et Entcheva, 2003). L'induction des gènes bioB, bioD et bioF suggère que la disponibilité de la biotine dans le tractus urinaire est faible d'où la nécessité, pour la bactérie, de synthétiser les enzymes nécessaire à la synthèse de ce cofacteur.

Processus cellulaires. Plusieurs gènes responsables de la réponse au stress semblaient être réprimés dans la vessie et dans les reins suite à une infection de 48 heures chez la souris par la souche E. coli CFT073. Un fait intéressant est la répression des gènes osmC, osmY et betA (tableau 3.5) dans la vessie. Les gènes osmC, osmY et betA sont normalement induits dans des conditions d'hyperosmolarité (concentration élevée en sel ou acidité élevée) (Weber et al., 2005) et de manque de nutriments. Le gène osmC code pour une protéine non essentielle qui possède une activité de peroxydase avec une affinité plus grande pour les hydroperoxydes organiques (Lesniak, Barton et Nikolov, 2003). Le gène osmY code pour une protéine périplasmique induite en condition de stress osmotique (Yim, Brems et Villarejo, 1994). Le gène betA, qui fait partie de l'opéron betAB, code pour une protéine périplasmique (glycine betaine binding protein) impliquée dans l'adaptation de l'enveloppe cellulaire lors de conditions d'hyperosmolarité (Yim, Brems et Villarejo, 1994). La répression de ces gènes suggère que les bactéries ne semblaient pas subir de stress osmotique dans les organes. Soit que plusieurs des bactéries retrouvées dans les organes colonisés n'étaient pas en contact avec l'urine, soit que l'urine contenue dans la vessie n'avait pas une osmolarité élevée. Le gène osmY est sous le contrôle du facteur σ^{S} (codé par le gène *rpoS*). Le facteur σ^{S} est le régulateur principal de l'expression de osmY lors de stress osmotique et de l'entrée en phase stationnaire (Yim, Brems et Villarejo, 1994). Toutefois, l'analyse statistique des données de biopuces n'a pas permis d'observer un résultat significatif pour le gène rpoS.

Fonctions régulatrices. Le gène dps est hautement réprimé dans les deux organes (tableau 3.5). Le gène dps code pour une protéine liant l'ADN afin de protéger la cellule contre le stress (comme un manque de nutriments) lors de la phase stationnaire. Cette protéine est la plus abondamment exprimée lors du passage de la cellule de la phase exponentielle à la phase stationnaire. Pendant la phase stationnaire, la protéine Dps se lie au chromosome bactérien afin de former un complexe très ordonné et très stable de nucléoprotéines. Ce complexe, aussi appelé le biocristal, est unique à la phase stationnaire. C'est la formation du biocristal qui permet à la protéine Dps d'affecter l'expression de certains gènes et de protéger l'ADN chromosomal contre les dommages oxydatifs par exemple (Nair et Finkel, 2004). Lorsque les cellules sont en phase exponentielle, Dps est rapidement dégradé par les protéase ClpXP (surtout) et ClpAP et Dps dépend directement de l'activité de ClpXP (Stephani, Weichart et Hengge, 2003). La sous-unité protéolytique de la protéase est codée par le gène clpP qui fait partie également du régulon de choc thermique à la chaleur (Kroh et Simon, 1990; Damerau et St John, 1993). Les données obtenues suggèrent que les bactéries ne devaient pas se retrouver en phase stationnaire ni en condition de stress tel que démontré dans le paragraphe précédent. Elles devaient vraisemblablement être en phase exponentielle à ce niveau de l'infection. La répression simultanée du gène clpP (tableau 3.5) pourrait s'expliquer, en partie, à cause qu'il n'y avait pas de Dps à cliver. Ces observations suggèrent, encore une fois, que les bactéries ne se retrouvaient pas en condition de stress osmotique et qu'elles devaient être en phase exponentielle au moment de la récolte des organes.

Contrairement à nos résultats, l'expérience de Snyder et al. n'a démontré aucun changement dans l'expression (in vivo vs in vitro) des gènes répondant aux changements de pH, au stress oxydatif, aux dommages à l'ADN ou encore au choc thermique (chaud et froid) (Snyder et al., 2004). Encore une fois, les multiples différences dans le protocole de manipulation peut expliquer les divergences au niveau des résultats obtenus.

Le gène le plus fortement réprimé dans la vessie est le gène fnr (tableaux 3.5). La protéine Fnr est un régulateur transcriptionnel global positif qui est impliqué au niveau du

métabolisme anaérobique et qui contrôle l'expression du formate et du nitrate réductases. Le nitrate réductase joue un rôle dans l'assimilation de l'azote (nitrate → nitrite → ammoniaque) et dans le métabolisme oxydatif (le nitrate devient un accepteur d'électrons pour la réduction d'intermédiaires métaboliques). En d'autres termes, le nitrate est utilisé au lieu de l'oxygène pour le métabolisme respiratoire. La nitrate réductase est donc induite par le nitrate et réprimée par l'oxygène. Les enzymes induites, découlant du métabolisme oxydatif, peuvent aussi être associées aux processus permettant l'assimilation de l'ammoniaque et de l'azote (Stock, Ninfa et Stock, 1989; Shalel-Levanon, San et Bennett, 2005). La protéine Fnr permet aussi le maintien de la hiérarchie du métabolisme (la respiration en aérobie est préférée à la respiration en anaérobie qui est elle-même préférée à la fermentation) en évaluant la disponibilité de l'oxygène dans l'environnement de la bactérie (Crack, Green et Thomson, 2004). Le fait que ce gène soit réprimé (tableau 3.5) entre en contradiction avec les données précédentes qui semblaient indiquer qu'un environnement anaérobique résidait dans les organes lors d'ITU. Toutefois, cette répression pourrait également s'expliquer par le fait que la bactérie pourrait se retrouver dans un environnement contenant peu d'azote comme expliqué plus tôt. L'absence de nitrate serait à la base de la répression de la nitrate réductase. Dans le cas de l'expérience de Snyder et al., ils ont remarqué que plusieurs des gènes induits en anaérobiose et justement régulés par Fnr étaient réprimés lors de conditions in vivo (dans l'urine récoltée). Le gène fnr, quant à lui, est resté inchangé in vivo et in vitro (Snyder et al., 2004). Une étude de Patten et al. (2004) a démontré que le facteur o^S induisait la répression du gène fnr lors de l'entrée en phase stationnaire tandis que les gènes dps et osmY étaient régulés positivement par le même facteur dans les mêmes conditions (Patten et al., 2004). Toutefois, cette expérience n'arrive pas à expliquer totalement la répression du gène fnr puisque des données semblent démontrer que E. coli CFT073 était en phase exponentielle lors de la récolte des organes; la répression des gènes dps et osmY venant renforcer cette hypothèse. Le fait que le gène fnr soit un régulateur transcriptionnel global implique qu'il doit posséder de multiples fonctions touchant plusieurs gènes et que sa répression pourrait s'expliquer de plusieurs façons.

Fonctions putatives ou inconnues. Plus de la moitié des gènes dont le résultat est significatif codent pour des protéines aux fonctions putatives ou totalement inconnues. Il est difficile d'analyser ces gènes puisque très peu d'informations sont disponibles dans la littérature. Toutefois, quelques observations antérieures peuvent permettre d'émettre des hypothèses quant aux fonctions de ces gènes. Par exemple, la fonction du gène yhhY (hautement induit, tableau 3.4) n'a pas encore été identifiée. Les seules informations connues au sujet de ce gène se rapportent à une étude qui a démontré que ce gène serait régulé par Fur. Fur est un régulateur transcriptionnel global impliqué dans plusieurs voies métaboliques notamment dans la régulation des protéines qui participent à l'obtention du fer ferrique (Fe³⁺). Il utilise le fer ferreux (Fe²⁺) comme corépresseur afin de contrôler l'expression de plusieurs opérons chez E. coli. En fait, Fur contrôle la régulation de la capture du fer, mais aussi la respiration en aérobie, le chimiotactisme, la synthèse des acides aminés et des précurseurs d'ADN, le métabolisme des sucres, la protection de la cellule contre les dommages oxydatifs et les gènes codant pour des toxines bactériennes. Les gènes qui sont sous le contrôle de Fur possèdent des boîtes Fur (Fur boxes) dans la région au niveau de leurs promoteurs. Il semblerait qu'il y ait deux boîtes Fur se chevauchant en amont du promoteur du gène yhhY, ce qui impliquerait une régulation de ce gène par Fur et peut-être un rôle dans l'obtention du fer (Vassinova et Kozyrev, 2000). Toutefois, aucun résultat significatif n'a pu être observé pour le gène fur d'où l'incapacité de vérifier la corrélation qui pourrait exister entre fur et yhhY. Il a toutefois été démontré qu'un mutant fur permettait l'induction de gènes tels que ceux qui codent pour l'entérobactine et la répression du gène yhhY (McHugh et al., 2003). Nos résultats démontrent que l'expression des gènes entA, entB et entE, codant pour l'entérobactine et qui sont régulés négativement par Fur (Brickman, Ozenberger et McIntosh, 1990; Christoffersen et al., 2001; Lavrrar, Christoffersen et McIntosh, 2002), était réprimée dans les deux organes (données non présentées). Ces données suggèrent une régulation positive par Fur pour le gène yhhY et une régulation négative par le même régulateur pour les gènes entABE. Il semblerait donc que le gène fur soit un régulateur transcriptionnel positif pour le gène yhhY.

Afin de vérifier les données de biopuces obtenues, une expérience de qRT-PCR a été effectuée sur quatre gènes choisis parmi les résultats significatifs obtenus. Évidemment, les données de qRT-PCR sont beaucoup plus fiables que les données des biopuces puisque c'est l'ADNc qui est directement amplifié de façon constante et de façon quantitative. Cette amplification est donc beaucoup moins sujette aux variations dues aux manipulations contrairement aux biopuces qui impliquent un phénomène de compétition (Poitras et Houde, 2002; Shelburne et Musser, 2004). Les résultats de qRT-PCR offre donc des résultats beaucoup plus précis avec une plus grande sensibilité et présente un éventail plus important de données. Le qRT-PCR devient alors un bon complément lorsqu'un sous-groupe de résultats de biopuces nécessite une analyse plus poussée (Brokx et al., 2004). De plus, les biopuces ne mesurent que de façon semi-quantitative l'abondance relative des différents transcrits (Conway et Schoolnik, 2003). En fait, c'est la combinaison des deux techniques qui permet d'avoir les résultats plus fiables. Dans le cas du présent projet de recherche, les résultats de qRT-PCR corrélaient avec les résultats de biopuces. Les données significatives de biopuces obtenues ont donc pu être analysées et des conclusions ont pu être apportées.

Les résultats obtenus ont donc permis l'étude de l'expression d'une panoplie de gènes, aux fonctions connues et inconnues, lors d'ITU dans le modèle de la souris. Ces résultats permettent de mieux comprendre les différents événements qui ont lieu dans le tractus urinaire de la souris. Ils permettent aussi d'émettre des hypothèses quant aux fonctions de ces gènes comme dans le cas du gène *yhhY*. Bien entendu, une analyse plus complète à l'aide d'une biopuce contenant l'ensemble des gènes du génome d'*E. coli* CFT073 nous aurait permis d'étudier les gènes conservés autant que les gènes pathospécifiques. Cette dernière étude aurait impliqué l'étude de l'interrelation entre le métabolisme de base et la virulence.

Conclusion

En résumé, ce projet de recherche reposait sur l'analyse de l'expression différentielle des gènes conservés dans la vessie et les reins de souris femelles infectées au niveau du tractus urinaire par la voie ascendante. Dans le cas de l'article de Snyder et al., le même modèle d'infection a été utilisé afin de cibler les gènes induits dans l'urine provenant de souris infectées comme dans notre cas. Étant donné les divergences au niveau du protocole expérimental, les résultats obtenus diffèrent à certains endroits. De plus, la stringence de l'analyse statistique, la nôtre ayant été plus stringente, peut grandement influencer les gènes ciblés. Leur expérience a apporté les conclusions suivantes: les bactéries poussent en aérobie, elles utilisent les hexuronates et les hexanates comme source de carbone, il y a une forte osmolarité dans l'urine et l'azote est un facteur limitant dans l'urine. Dans notre cas, ce sont plutôt les conclusions suivantes que nous avons pu avancer: les bactéries se retrouvent en anaérobiose, elles utilisent les hexuronates, entre autres, comme source de carbone, elles ne subissent pas de choc thermique ou osmotique et l'azote semble (résultat ambiguë) être un facteur limitant dans la vessie et les reins.

La première partie de ce projet de recherche est donc terminée. Une importante banque de gènes conservés à étudier a été ciblée. Maintenant, la suite de ce projet va consister davantage en un travail bactériologique. Les gènes conservés suscitant un intérêt au niveau de la virulence seront tout d'abord vérifier par qRT-PCR, comme présentés plus tôt, afin de valider les résultats de biopuces. Ensuite, il faudra procéder à la mutagenèse de ces derniers et à la réinfection des souris afin de voir si leur absence diminue la capacité du pathogène d'infecter et si la restauration du gène permettra d'infecter de nouveau les souris (remplir tous les postulats de Koch). À ce moment, nous serons réellement en position d'établir des conclusions quant aux gènes conservés qui ont un effet sur la virulence. Cette deuxième partie sera très importante, surtout au niveau des gènes aux fonctions putatives ou inconnues, puisque ces derniers pourraient apporter de nouvelles informations aux connaissances actuelles sur le fonctionnement des infections urinaires causées par la bactérie *E. coli*.

Cette étude a permis de confirmer certaines données déjà connues et d'apporter de nouveaux questionnements grâce à la grande quantité de gènes qui codent pour des produits aux fonctions putatives ou inconnues. Par exemple, nous savons que l'azote et les pyrimidines semblent réellement être des facteurs limitants dans la vessie et les reins.

Bien souvent, ce ne sont que les gènes de virulence qui sont étudiés dans la pathogénicité, mais il ne faut pas oublier que sans l'activité du métabolisme de base, plusieurs de ces gènes ne présenteraient peut-être pas la même activité ou encore le même niveau de virulence. C'est pour cette raison que l'une des perspectives de ce projet de recherche serait de reprendre l'ensemble des manipulations, mais avec une biopuce d'*E. coli* CFT073, ce qui permettrait l'étude des gènes du métabolisme de base et des gènes de pathogénicité. C'est donc l'ensemble des gènes, conservés et pathospécifiques, et leurs interactions qui vont nous permettre de poser de vraies conclusions quant au fonctionnement des pathogènes lors d'une infection.

Annexe A

Tableau A.1 Gènes induits in vivo lors de l'infection du tractus urinaire chez la souris.

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio ^a reins/LB
Métabolis	me intermédiaire central		
smtA	Méthyltransférase S-adénosylméthionine-dépendante	5.799	5.256
Biosynthè	se et métabolisme des acides aminés		
asnA	L-asparaginase I cytoplasmique	6.898	6.927
asnB	Asparagine synthétase B	2.929	3.057
aspC	Aspartate aminotransférase	1.344	0.941
glnG	Régulateur de réponse pour gln (senseur glnL) (régulateur d'azote I, NRI)	7.548	7.478
hisL	Peptide signal de l'opéron his	4.834	5.677
ilvD	Déshydratase dihydroxy acide	4.182	4.566
ilvG 1	Grande sous-unité de l'acétolactate synthase II, cryptique, interrompu	2.564	3.046
leuD	Sous-unité de l'isopropylmalate isomérase	7.086	7.004
lysC	Aspartokinase III, lysine sensible	8.110	8.293
metC	Cystathionine bêta-lyase (bêta-cystathionase)	1.213	1.632
Biosynthè	se et métabolisme des acides gras		
cdsA	CDP-diglycéride synthétase	3.424	3.851
plsC	1-acyl-sn-glycérol-3-phosphate acyltransférase	5.025	4.912
tesB	Acyl-CoA thioestérase II	1.745	1.646
Riosynthà	se et métabolisme des nucléotides		
amn	AMP nucléosidase	3.751	3.001
carA	Carbamoyl-phosphate synthétase, sous-unité glutamine	7.705	
purL	Phosphoribosylformyl-glycinéamide synthétase = FGAM synthétase		7.995
udp	Uridine phosphorylase	3.670 10.577	3.992 10.491
-	me énergétique	20077	201.12
асеЕ	Pyruvate déshydrogénase (composante de la décarboxylase)	1 (57	1.556
		1.657	1.556
aceF	Pyruvate déshydrogénase (composante de la dihydrolipoyltransacétylase)	4.518	4.092
acnB adhE	Aconitate hydrase B	1.333	1.252
aans	Alcool déshydrogénase, acétaldéhyde déshydrogénase, pyruvate formate- lyase désactivase	4.707	4.444
atpH	ATP synthase liée à la membrane, secteur F1, sous-unité delta	3.958	4.122
dsbE	Disulfide oxydoréductase (biogenèse du cytochrome c)	6.087	7.122 b
gltA	Citrate synthase	2.143	1.706
hybA	Petite sous-unité de l'hydrogénase-2	6.570	6.751
hypD	Joue un rôle structural dans la maturation des 3 hydrogénases	4.158	
hypE	Joue un rôle structural dans la maturation des 3 hydrogénases		4.186
lpdA	Lipoamide déshydrogénase (NADH); composante de la 2-oxodéshydrogénase	7.455	7.831
ірил	et des complexes du pyruvate; L-protéine du complexe de clivage de la glycine	1.723	1.812
nrfF	Composante du complexe de nitrite réductase formate-dépendante	8.461	8.788
nrfG	Composante du complexe de nitrite réductase formate-dépendante	4.730	5.097
pdhR	Régulateur transcriptionnel du complexe de pyruvate déshydrogénase	4.441	5.442
pflB	Formate acétyltransférase 1	1.811	1.563
2112	i orizone necej inanticiate i	110.1	1.202

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log₂ratio¹ reins/LB
Catabolist	ne des composés carbonés		
focA	Transporteur probable du formate (canal 1 du formate)	3.896	3.105
fruA	Système PTS, protéine de transport spécifique au fructose	2.145	2.066
galK	Galactokinase	2.437	2.707
galR	Répresseur de l'opéron galETK	2.815	2.488
galU	Glucose-1-phosphate uridylyltransférase	3.750	3.812
glk	Glucokinase	6.932	6.963
malI	Répresseur des gènes malX et malY	2.844	3.035
mtlD	Mannitol-1-phosphate déshydrogénase	7.238	7.063
rbsR	Régulateur de l'opéron <i>rbs</i>	2.357	1.997
uidR	Répresseur de l'opéron <i>uid</i>	2.926	2.885
uxaB	Altronate oxydoréductase	9.550	9.706
		7.550	3.700
	se des cofacteurs	0.404	0.065
bioB	Biotine synthase	2.494	2.065
bioD	Déthiobiotine synthétase	6.831	6.818
bioF	8-amino-7-oxononanoate synthase	7.651	7.356
cobT	Nucléotide nicotinate diméthylbenzimidazole-P phophoribosyl transférase	3.569	3.589
cobU	Cobinamide kinase/Cobinamide phosphate guanylyltransférase	9.598	9.424
entC	Isochorismate hydroxymutase 2, biosynthèse de l'entérobactine	3.174	3.942
hemB	5-aminolévulinate déshydratase = porphobilinogène synthase	3.249	3.941
nrdH	Protéine ressemblant à la glutarédoxine; donneur d'hydrogène	2.232	2.440
ribD	Pyrimidine bifonctionnelle désaminase/réductase dans la voie de synthèse du riboflavine	2.917	3.111
ubiG	3-déméthylubiquinone-9 3-méthyltransférase et 2-octaprényl-6-hydroxy phénol méthylase	6.242	7.195
Rénlicatio	n de l'ADN		
dinD	Protéine induite lorsque l'ADN est endommagé	5.316	5.934
holA	ADN polymérase III, sous-unité delta	3.117	4.173
holC	ADN polymérase III, sous-unité chi	4.043	5.354
iciA	Inhibiteur de l'initiation de la réplication, lie à 13-mers de l'oriC	5.184	5.096
Transcrip		2.450	b
argS	ARNt de l'arginine synthétase		5.074
lysS	ARNt de la lysine synthétase, constitutif; suppresseur de la mutation ColE1 dans l'amorce d'ARN	5.592	
pcnB	Polymérase I poly(A)	4.726	5.908
selA	Sélénocystéine synthase: ARNt-L-seryl (Ser) sélénium transférase	2.470	2.575
serS	ARNt de la sérine synthétase; chargement aussi l'ARNt de la sélénocystéine avec la sérine	1.861	1.768
Traductio	on .		
ppiA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A (rotamase A)	8.493	7.950
rimK	Protéine ribosomale S6; protéine de modification	7.275	6.790
rplJ	Sous-unité ribosomale 50S de la protéine L10	2.721	2.638
rplP	Sous-unité ribosomale 50S de la protéine L16	5.357	5.279
rpmB	Sous-unité ribosomale 50S de la protéine L28	4.534	4.405
rpsB	Sous-unité ribosomale 50S de la protéine S2	2.497	2.124
		3.091	3.028
	Sous-unité ribosomale 508 de la proteine 85	2.021	
rpsE rpsJ	Sous-unité ribosomale 50S de la protéine S5 Sous-unité ribosomale 50S de la protéine S10	2.435	3.026

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio reins/LB
Processus	cellulaires		
acrR	Répresseur de l'opéron acrAB	1.716	1.477
ahpF	Alkyl hydropéroxyde réductase, sous-unité F52a; détoxification de	3.487	3.993
	l'hydropéroxyde		
ftsK	Protéine de la division cellulaire	4.203	3.351
ftsZ	Division cellulaire; forme anneau circonférentiel; protéine liant le GTP	1.809	1.823
	ressemblant à la tubuline et GTPase		
tolC	Canal de la membrane externe; tolérance spécifique à la colicine E1; ségrégation du chromosome-fille	3.319	3.713
Structure	s cellulaires		
crl	Régulateur transcriptionnel du gène cryptique csgA pour les fibres curli de surface	2.159	2.873
murC	Enzyme ajoutant du L-alanine, UDP-N-acetyl-muramate:alanine ligase	3.346	3.495
murF	D-alanine: enzyme ajoutant du D-alanine	1.652	2.143
nanT	Transporteur d'acide sialique	2.830	2.658
slt	Transglycosylase de muréine soluble et lytique	3.078	3.300
Phages, tr	ansposons, plasmides		
pspF	Activateur transcriptionnel de l'opéron psp	7.134	7.515
Fonctions	régulatrices		
гроН	ARN polymérase, facteur sigma 32; régulation des protéines induites à hautes	6.780	6.959
	températures		
rspA	Protéine sensible au manque de nutriments	2.274	2.642
spoT	(p)ppGpp synthétase II; aussi guanosine-3',5'-bis pyrophosphate 3'- pyrophosphohydrolase	3.570	4.052
Transport			
exuT	Transport des hexuronates	6.182	6.526
fepC	Composante du transport de l'entérobactine liant ATP	6.820	7.206
glpF	Facilite la diffusion du glycérol	3.825	3.739
glpT	sn-glycérol-3-phosphate perméase	3.296	3.290
manX	Enzyme PTS IIAB, spécifique au mannose	4.491	4.157
manY	Enzyme PTS IIC, spécifique au mannose	3.510	3.978
mgtA	ATPase transportant le Mg2+, P-type 1	3.499	3.240
uhpT	Protéine de transport de l'hexose phosphate	4.854	4.751
	que, non classifié, inconnu		
b0846	Régulateur transcriptionnel putatif de type DEOR	5.681	6.069
b0868	Nucléotide putatif du sucre di-P épimérase ou déshydratase	5.161	5.813
b0960	Protéine hypothétique, ORF	3.135	3.135
b1541	Protéine hypothétique, ORF	5.410	5.500
b1583	Protéine hypothétique, ORF	5.682	5.900
b1722	Protéine hypothétique, ORF	6.714	5.479
b2506	Protéine putative de la membrane	4.627	5.097
b2500 b2618	Protéine hypothétique, ORF	2.654	3.056
b3042	Protéine hypothétique, ORF	3.314	4.104
b3472	Proteine hypothétique, ORF	2.358	2.714
		5.085	
cspF	Protéine de choc au froid		4.403
cspG	Protéine du choc au froid ; homologue chez Salmonella	1.694	1.791
fhuF a:v	Protéine hypothétique, ORF	4.785	4.699
fliY	Protéine putative de transport liée au périplasme	6.255	6.350
mipB	Transaldolase putative	2.495	3.694
иир	Composante d'un système de transport liant l'ATP; putatif	1.815	2.148

Gène	Produit du gène	Log₂ratioª vessies/LB	Log ₂ ratio ^a reins/LB
	D. A.C. and A.C. and O.D.F.	2.020	2.702
yaeB	Protéine hypothétique, ORF	3.038	3.793
yaeS	Protéine hypothétique, ORF	2.047	2.676
yafS	Protéine hypothétique, ORF	3.283	2.779
yafV	Enzyme putatif EC 3.5. de type amidase	2.893	4.350
yaj Q	Proteine hypothétique, ORF	2.875	3.072
ybdL	Aminotransférase putative	3.542	4.529
ybgE	Protéine hypothétique, ORF	4.779	4.688
ybhK	Protéine putative structurale	6.539	6.421
ybhS	Protéine hypothétique, ORF	6.709	7.119
ybiW	Acétyltransférase formate putatif	6.567	6.521
ybiY	Enzyme activatrice putative pyruvate formate-lyase 2	6.235	7.445
ycgC	Enzyme I putatif du système PTS	3.694	4.174
ychK	Protéine hypothétique, ORF	3.589	3.093
ydiA	Protéine hypothétique, ORF	7.227	7.163
ydjA	Protéine hypothétique, ORF	9.256	8.922
yehW	Protéine perméase putative d'un système de transport	2.805	3.395
yejB	Protéine perméase putative d'un système de transport	5.750	6.063
yfgA	Protéine putative de la membrane	2.889	2.847
ygfE	Protéine hypothétique, ORF	3.634	4.014
ygiX	Régulateur transcriptionnel putatif à 2 composantes	4.461	6.126
yhcJ	Enzyme putative	6.692	6.723
yhdE	Protéine hypothétique, ORF	5.914	6.711
yhfA	Protéine hypothétique, ORF	3.343	3.899
yhgG	Protéine hypothétique, ORF	4.279	3.397
yhhY	Protéine hypothétique, ORF	10.001	10.709
yhjT	Protéine hypothétique, ORF	4.881	4.366
yibL	Protéine hypothétique, ORF	2.609	2.917
yifB	Régulateur putatif à 2 composantes	5.285	5.157
yiiQ	Protéine hypothétique, ORF	2.272	2.002
yiiU	Protéine hypothétique, ORF	2.436	2.963
yij O	Protéine régulatrice putative de type ARAC	3.771	4.598
yjdA	Vimentine putative	5.182	5.647
yjj W	Enzyme activatrice putative	5.577	6.781
yljA	Protéine hypothétique, ORF	2.290	1.794
ymfL	Protéine hypothétique, ORF	3.385	2.915
yqhA	Protéine hypothétique, ORF	6.033	5.583
ytfA	Protéine hypothétique, ORF	3.467	3.230
ytfB	Protéine hypothétique, ORF	3.564	3.610

^a Le \log_2 ratio réfère à la croissance in vivo relativement à la croissance in vitro (LB). ^b Signal sous le seuil de détection. Valeur P < 0,001

Tableau A.2 Gènes réprimés in vivo lors de l'infection du tractus urinaire.

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio ^s reins/LB
/létabolisme	intermédiaire central		
caiA	Oxydoréductase probable de l'opéron carnitine	-3.398	-5.023
caiF	Régulateur transcriptionnel de l'opéron cai	-3.995	b
fpr	Réductase du ferredoxine-NADP	-2.401	-2,660
gcvA	Régulateur positif de l'opéron gcv	-3.228	-4.166
gntR	Régulateur de l'opéron gluconate (gnt)	-4.520	-7.020
nagA	N-acétylglucosamine-6-phosphate désacétylase	-5.219	-6.303
nagC	Répresseur transcriptionnel de l'opéron nag (N-acétylglucosamine)	-3.724	-3.921
rnk	Régulateur du nucléoside diphosphate kinase	-3.633	-2.062
speE	Spermidine synthase = putrescine aminopropyltransférase	-4.585	-5.002
trxB	Thiorédoxine réductase	-2.751	-3.841
iosynthàse e	t métabolisme des acides aminés		
aroG	3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate synthase (DAHP	-4.205	-4.262
4,00	synthétase, répression par la phénylalanine)	7.203	→.∠∪∠
asd	Aspartate-semialdéhyde déshydrogénase	-3.104	-3.849
dadX	Aspartate-semiadenyue desnyurogenase Alanine racémase 2; catabolique		-
daax dapE	N-succinyl-diaminopimélate désacylase	-4.196 5.137	-4.817
		-5.137	-4.649
dapF	Diaminopimélate épimérase	-4.969	-5.157
glnA	Glutamine synthétase	-4.742	-3.147
glnD	Uridylyltransférase/dé-uridylylation de la protéine PII	-2.680	-3.322
sdaA	L-sérine désaminase	-3.956	-5.141
serC	3-phosphosérine aminotransférase	-4.985	-5.679
thrA	Aspartokinase I, homosérine déshydrogénase I	-4.323	b
tnaA	Tryptophanase	-4.058	-4.425
	t métabolisme des acides gras		-
atoE	Transporteur de courtes chaînes d'acides gras	-4.256	b
fabA	β-hydroxyacyl-ACP déshydratase, trans-2-décénoyl-ACP-isomérase	-3.339	-3.446
fabB	3-oxoacyl-[protéine porteuse d'acyl (ACP)] synthase I	-5.759	-6.221
nlpB	Lipoprotéine-34	-5.140	-5.217
pal	Lipoprotéine associée au peptidoglycan	-4.918	-6.616
pgsA	Phosphatidylglycérophosphate synthétase = CDP-1,2-diacyl-sn-glycéro-3- phosphate phosphatidyl transférase	-2.886	-3.340
plsX	Glycérolphosphate; auxotrophie dans un background de plsB	-4.711	-4.863
rlpA	Lipoprotéine mineure	-4.711 -5.221	-4.603
-	t métabolisme des nucléotides		
oosyntnese e adk	Activité d'adénylate kinase; effet pléïotropique sur l'activité de la	-2.083	-3.220
uun	glycérol-3-phosphate acyltransférase	-2.083	-3.220
cmk	Cytidylate kinase	-3.488	-3.578
deoA	Thymidine phosphorylase	-3.476	-3.171
guaC	GMP réductase	-5.820	b
hpt	Hypoxanthine phosphoribosyltransférase	-4.299	-5.383
purA	Adénylosuccinate synthétase	-5.619	-5.809
purK	Phosphoribosylaminoimidazole carboxylase = AIR carboxylase, sous-	-4.369	-4.901
P	unité fixatrice de CO ₂	7.507	-7.201

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio reins/LB
létabolisme	énergétique		
acnA	Aconitate hydrase I	-4.365	-5.229
appC	Troisième cytochrome oxydase probable, sous-unité I	-5.592	-5.547
cyoA	Sous-unité II du cytochrome o ubiquinol oxydase	-5.332	-6.537
cyoB	Sous-unité I du cytochrome o ubiquinol oxydase	-6.178	-6.198
fldB	Flavodoxine II	-5.039	-7.439
mdh	Malate déshydrogénase	-5.877	b
nuoC	Sous-unité du fragment connecteur de la NADH déshydrogénase I	-5.043	-5.190
nuoG	Sous-unité du fragment soluble de la NADH déshydrogénase I	-3.652	b
sdhA	Sous-unité de flavoprotéine de la succinate déshydrogénase	-3.882	-4.160
sdhD	Sous-unité hydrophobe de la succinate déshydrogénase	-5.266	-5.869
sucC	Succinyl-CoA synthétase, sous-unité bêta	-4.401	-4.749
atabolisme (des composés carbonés		1115
aer	Récepteur senseur aérotaxis	-5.596	b
aldB	Aldéhyde déshydrogénase B (lactaldéhyde déshydrogénase)	-5.536	-5.556
araJ	Impliqué dans le transport et le processus des polymères d'arabinose	-4.045	-4.802
bglA	6-phospho-bêta-glucosidase A; cryptique	-5.570	-5.471
galE	UDP-galactose-4-épimérase	-3.235	-2.699
hcaT	Transporteur MFS (major facilitator superfamily)	-5.731	-5.585
pgm	Phosphoglucomutase	-3.103	-3.738
sfsA	Régulateur probable pour le métabolisme du maltose	-5.998	-5.017
osynthèse d	es cofacteurs		
entA	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate déshydrogénase, biosynthèse de l'entérobactine	-5.438	-4.925
entB	2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate synthétase, isochorismatase	-3.104	-3.757
entE	2,3-dihydroxybenzoate-AMP ligase	-2.109	-2.061
folC	Dihydrofolate:folylpolyglutamate synthétase; dihydrofolate synthétase	-5.771	-7.915
gor	Glutathione oxydoréductase	-2.331	-2.131
hemH	Ferrochelatase: enzyme finale de la biosynthèse de l'hème	-4.073	-6.128
hemL	Glutamate-1-semialdéhyde aminotransférase (aminomutase)	-6.970	b
menB	Acide dihydroxynaphtoique synthétase	-4.922	-5.572
moeA	Biosynthèse du molybdoptérine	-2.676	-3.162
nadC	Quinolinate phosphoribosyltransférase	-3.525	-4.544
pdxA	Biosynthèse pyridoxine	-5.503	-5.673
pncB	Nicotinate phosphoribosyltransférase	-4.243	-5.105
thiJ	Synthèse du 4-methyl-5(bêta-hydroxyéthyl)-thiazole monophosphate	-4.298	-4.740
thiL	Thiamine-monophosphate kinase	-5.415	-6.229
éplication d			
cbpA	Protéine liant l'ADN courbé; fonctions étroitement reliées à DnaJ	-4.878	b
dnaB	Hélicase de l'ADN réplicative; partie du primosome	-2.376	-2.496
dnaE	ADN polymérase III; sous-unité alpha	-3.838	-4.949
dnaK	Chaperonne Hsp70; biosynthèse de l'ADN; autorégulation par les protéines du choc thermique	-6.212	-6.441
himD	IHF (integration host factor); sous-unité bêta; recombinaison site- spécifique	-3.661	-4.284
phrB	Désoxyribodipyrimidine photolyase (photo-réactivation)	-2.280	-2.385
polB	ADN polymérase II	-4.001	-4.756
recQ	Hélicase d'ADN ATP-dépendante	-4.460	-5.164
rob	Protéine liant l'origine droite	-5.237	-5.153

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio ^a reins/LB
topA	ADN topoisomérase de type I; protéine oméga	-4.220	-4.364
topB	ADN topoisomérase III	-3.574	-3.563
uvrA	Sous-unité A de la nucléase d'excision	-3.646	-4.542
uvrB	Sous-unité B de la nucléase d'excision	-2.625	-2.956
xseB	Exonucléase VII; petite sous-unité	-3.854	-3.545
Franscription			
aat	Leucyl, protéine ARNt-phénylalanyl transférase	-4.062	-5.622
leuS	ARNt leucine synthétase	-3.391	-3.564
proS	ARNt proline synthétase	-2.599	-2.790
rnt	RNase T; dégrade l'ARNt	-5.476	-5.664
Traduction			
clpP	Sous-unité protéolytique de la sérine protéase <i>clpA-clpP</i> ATP-dépendante; protéine du choc thermique F21.5	-6.983	-8.167
clpX	Composante de la sérine protéase ATP-dépendante, chaperonne	-4.471	-4.849
dsbA	Protéine disulfide isomérase I, essentielle pour la synthèse du cytochrome	-3.033	-3.467
	c et la réduction formate-dépendante	3.033	3.107
frr	Facteur relâcheur de ribosomes	-4.797	-5.885
hlpA	Protéine de type histone, localisée dans la membrane externe ou le nucléoïde	-2.844	-3.315
hslV	Protéine du choc thermique hslVU, protéasome reliée à la sous-unité de la peptidase	-4.839	-5.319
htrA	Sérine protéase périplasmique Do; protéine du choc thermique HtrA	-2.792	-4.010
hupB	Protéine HU-bêta liant l'ADN, NS1 (HU-1)	-2.049	-2.524
lolA	Protéine périplasmique qui effectue la translocation des lipoprotéines de la membrane interne vers la membrane externe	-3.581	-3.499
тар	Methionine aminopeptidase	-2.781	-3.136
pepA	Aminopeptidase A/I	-4.675	-4.334
pepN	Aminopeptidase N	-2.567	-4.837
rmf	Facteur de modulation des ribosomes	-2.207	-2.499
rpsH	Protéine S8 de la sous-unité ribosomale 30S et régulateur	-3.860	-4.567
secD	Protéine de sécrétion; protéine membranaire, partie d'un canal	-4.275	b
secF	Protéine de sécrétion, protéine membranaire	-5.039	-6.677
Processus cell	-		
acrD	Sensibilité à l'acriflavine, protéine intégrale membranaire, pompe à efflux probable	-1.416	-1.810
b1840	Protéine putative de résistance	-6.001	b
betA	Flavoprotéine, choline déshydrogénase	-4.837	b
ftsA	Protéine de la division cellulaire liant l'ATP, processus de septation, forme un complexe avec FtsZ, associé à des jonctions de la membrane externe et interne	-4.153	-4.084
ftsN	Protéine essentielle à la division cellulaire	-3.353	-4.097
hslU	Protéine du choc thermique hslVU, sous-unité de l'ATPase, homologues des chaperonnes	-3.820	-3.964
ksgA	S-adenosylméthionine-6-N',N'-adénosyl (ARNr) diméthyltransférase	-6.085	-6.072
mrdA	Élongation cellulaire, phase e; peptidoglycan synthétase; protéine 2 liant la pénicilline	-3.864	-5.464
osmC	Peroxydase inductible en condition d'hyperosmolarité	-5.311	b
osm Y	Protéine périplasmique inductible en condition d'hyperosmolarité	-7.154	b
sodC	Précurseur de la superoxyde dismutase (Cu-Zn)	-4.786	-5.200

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ration reins/LB
Structures cel	Ilulaires		
amiB	N-acétylmuramoyl-l-alanine amidase II; muréine hydrolase	-4.150	-4.161
btuB	Récepteur de la membrane externe pour le transport de la vitamine B12, colicines E et des bactériophages BF23	-3.013	-2.924
ddlA	Ligase A de la D-alanine-D_alanine	-6.185	b
mraY	Phospho-N-acétylmuramoyl-pentapeptide transférase	-4.197	-4.816
murD	UDP-N-acétylmuramoylalanine-D-glutamate ligase	-2.770	-2.238
murG	UDP-N-acétylglucosamine:N-acétylmuramyl-(pentapeptide)	-2.787	-2.868
	pyrophosphoryl-undécaprénol N-acétylglucosamine transférase		
rcsF	Régulateur de la synthèse de l'acide colanique; interagit avec RcsB	-4.353	-5.755
wzzB	Régulateur de la longueur de l'antigène O, composante de la chaîne des	-5.961	-6.265
	lipopolysaccharides		
Phages, trans	posons, plasmides		
rhsA	Protéine rhsA dans l'élément rhs	-1.493	-1.327
Fonctions rég	ulatrices/dégradation des protéines		
dps	Régulateur global, conditions de privation	-7.455	-8.930
cstA	Protéine impliquée dans la réponse au manque de carbone	-5.050	-4.303
fnr	Régulateur transcriptionnel en aérobie, de la respiration anaérobique et de la balance osmotique	-8.408	ь
Fransport			
btuD	Composante d'un système de transport de la vitamine B12 liant l'ATP	-3.528	-3.742
chaC	Régulateur du transport de cations	-6.005	ь
cmr	Pompe à efflux à force proton motrice	-3.973	-4.405
cydC	Composante reliée au transport du cytochrome liant l'ATP	-2.686	-2.702
gltL	Protéine appartenant au système de transport du glutamate/aspartate liant l'ATP	-5.027	-4.518
gltS	Transport du glutamate	-4.343	-4.555
kefC	Antiporteur à efflux K+ efflux, régulé par le glutathione	-4.577	-4.873
lnt	Apolipoprotéine N-acyltransférase, protéine de l'homéostasie du cuivre, membrane interne	-4.786	-4.650
potA	Composante du transport des spermidines/putrescine liant l'ATP	-2.768	b
potF	Protéine périplasmique liant la putrescine; protéine perméase	-2.707	-3.684
putP	Symporteur majeur de sodium/proline	-2.890	-3.388
rbsC	Système de transport du D-ribose de haute affinité	-4.786	-5.263
sbp	Protéine périplasmique liant le sulfate	-4.081	-4.143
Hypothétique	e, non classifié, inconnu		
aefA	Protéine putative avec une hélice alpha	-4.072	-4.098
apbA	Impliqué dans la biosynthèse des la thiamine, biosynthèse des pyrimidines alternative	-3.097	-3.545
b0538	Régulateur putatif de transduction sensoriel	-4.766	-4.910
b0609	Protéine hypothétique, ORF	-3.051	-2.952
b0671	ARN putatif	-3.574	-3.658
b0817	Toxine putative	-4.587	-5.505
<i>b</i> 0829	Composante putative d'un système de transport liant l'ATP	-3.802	-4.826
<i>b0830</i>	Protéine putative de transport	-4.042	-4.461
<i>b0847</i>	Protéine putative de transport	-3.539	-3.385
<i>b0866</i>	Protéine hypothétique, ORF	-4.425	-5.539
b0867	Régulateur putatif	-3.800	-3.457
<i>b0965</i>	Protéine hypothétique, ORF	-3.957	-3.811
<i>b1191</i>	Protéine hypothétique, ORF	-4.138	-4.473

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ration reins/LB
b1428	Protéine hypothétique, ORF	-4.921	b
b1443	Perméase putative appartenant à un système de transport	-2.266	-2.744
b1593	Protéine hypothétique, ORF	-4.275	-3.859
	Protéine hypothétique, ORF	-3.758	-4.432
b1668		-4.325	-4.178
b1745	Protéine hypothétique, ORF	-4.323 -7.239	-4.178 b
b1809	Protéine hypothétique, ORF		b
b1955	Protéine hypothétique, ORF	-4.755 -3.617	-4.053
b2294	Protéine hypothétique, ORF		
b2324	Peptidase putative	-3.378	-3.687
b2331	Protéine hypothétique, ORF	-4.339	-5.759
b2359	Protéine hypothétique, ORF	-1.629	-2.053
b2433	Protéine hypothétique, ORF	-7.163	b
<i>b2529</i>	Protéine hypothétique, ORF	-4.797	-4.297
<i>b2896</i>	Protéine hypothétique, ORF	-5.354	b
<i>b2899</i>	Oxydoréductase putative	-6.810	-6.703
<i>b3052</i>	Kinase putative	-4.886	-5.181
citA	Protéine putative de type senseur	-6.931	-7.026
cof	Protéine hypothétique, ORF	-4.568	-6.779
csiE	Protéine hypothétique, ORF	-5.883	-6.436
cspD	Protéine du choc thermique au froid	-3.378	-4.143
cspE	Protéine du choc thermique au froid	-3.512	-3.474
cyaY	Protéine hypothétique, ORF	-5.053	-5.076
mdaA	Modulateur de l'activité de la drogue A	-4.697	-4.745
mdlA	Composante d'un système de transport liant l'ATP	-5.400	-3.982
pfs	Protéine hypothétique, ORF	-5.823	b
pqiA	Protéine A inductible au paraquat	-2.744	-2.044
pqu1 prpB	Phosphomutase 2 putative	-7.080	b
prpC	Citrate synthase putative; métabolisme propionate	-5.041	-4.458
	Protéine hypothétique, ORF	-6.645	b
prpD		-3.828	-3.853
prpE	Propionyl-CoA synthétase putative Protéine périplasmique reliée à la formation sphéroblaste	-4.506	-4.383
spy			
udhA	Oxydoréductase putative	-6.216	-6.112
vacB	Enzyme putative	-5.042	-5.725 ^b
xasA	Protéine sensible à l'acidité, transporteur putatif	-8.185	
yabC	Apolipoprotéine putative	-3.319	-3.671
yacA	Protéine hypothétique, ORF	-2.631	-3.729
yacL	Protéine hypothétique, ORF	-5.183	-5.187
yadP	Protéine hypothétique, ORF	-3.569	b
yadQ	Transporteur à canal putatif	-2.404	-2.560
yaeC	Lipoprotéine putative	-3.803	-5.555
yaeE	Perméase putative appartenant à un système de transport	-4.634	-5.472
yaeG	Protéine hypothétique, ORF	-4.514	-5.639
yafH	Acyl-CoA déshydrogénase putative	-5.254	b
yafJ	Amidotransférase putative	-4.514	-4.684
yahK	Oxydoréductase putative	-4.662	-5.713
yaiM	Estérase putative	-3.080	-4.898
yaiO	Protéine hypothétique, ORF	-1.410	-2.580
yaiW	Protéine hypothétique, ORF	-1.939	-2.832
yajG	Polymérase/protéinase putative	-5.913	b
yajO yajO	Xylose réductase NAD(P)H-dépendante putative	-3.657	-3.590
	Protéine hypothétique, ORF	-7.101	b
ybaA ybaB	Proteine hypothétique, ORF	-/.101 ^b	b
<i>vuuD</i>	LIGICHIC HYDOHICHQUE, ONE		

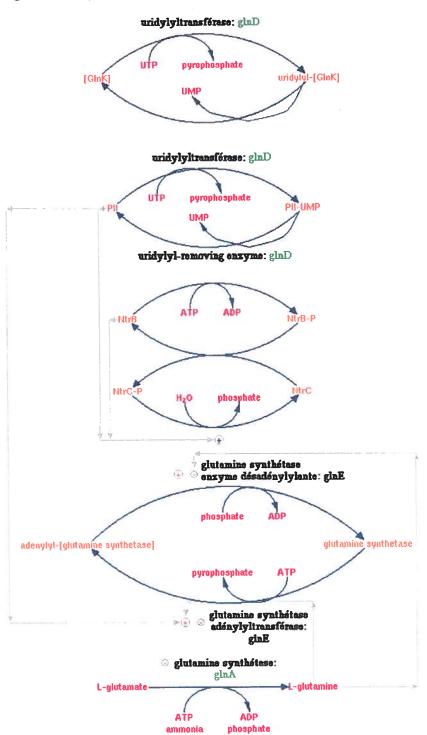
Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ rati reins/Ll
ybaP	Ligase putative	-2.969	b
ybaR	ATPase putative	-4.064	-3.830
ybaS	Glutaminase putative	-6.072	b
ybaT	Protéine de transport des acides aminés/amines putative	-5.442	-6.289
ybaY	Métabolisme des glycoprotéines/polysaccharides	-5.331	-6.095
ybaZ ybaZ	Protéine hypothétique, ORF	-3.682	-3.918
ybbF	Protéine hypothétique, ORF	-3.497	-3.700
ybbN	Protéine de type thiorédoxine putative	-3.832	-3.700 b
ybbU	Régulateur putatif	-4.864	-4.633
ybcI	Protéine hypothétique, ORF	-3.650	-3.422
ybdB	Protéine hypothétique, ORF	-5.768	b
ybdE ybdE	Composante putative du transport du fer de la membrane interne	-3.422	-3.368
ybdG	Transporteur putative	-5.745	-5.457
ybdK	Protéine hypothétique, ORF	-5.601	-J.437
ybdN	Protéine hypothétique, ORF	-3.636	-3.097
ybeL	Protéine putative avec une hélice alpha	-4.204	-3.683
ybeX	Protéine de transport putative	-5.899	-3.063
ybeX ybeY	Protéine de transport putative Protéine hypothétique, ORF	-6.015	ь
ybeZ	Protéine putative du régulon pho liant l'ATP	-6.760	-7.205
ybfE	Protéine hypothétique, ORF	-4.492	-7.203 -4.549
	Protéine hypothétique, ORF	-5.315	-5.274
ybfF		-4.351	-3.274 -4.964
ybgI	Protéine hypothétique, ORF		
ybgJ	Carboxylase putative	-4.131	-3.871
ybgL	Protéine putative de l'utilisation du lactame	-6.089	-7.516
ybhC	Pectinestérase putative	-5.549 5.006	-6.624
ybhQ	Protéine hypothétique, ORF	-5.096	-5.013
ybiK	Asparaginase putative	-4.182 5.605	-4.812
ybiS	Protéine hypothétique, ORF	-5.695	-5.853
ybiT	Composante putative d'un système de transport liant l'ATP	-5.439	-4.770
ybjO	Protéine hypothétique, ORF	-4.371 4.528	-4.834
ybjT	Enzyme putative dTDP-glucose	-4.538	-3.896
ybjU	Arylsulfatase putative	-5.803	-5.617
ybjX	Enzyme putative	-4.694	-6.199
ybjZ	Composante putative d'un système de transport liant l'ATP	-4.577	-4.456
ycaC	Protéine hypothétique, ORF	-4.231	-4.566
ycaP	Protéine hypothétique, ORF	-3.662	-4.012
yccK	Sulfite réductase putative	-4.320	-4.137
yccV	Protéine hypothétique, ORF	-4.480	b
ycd W	Déshydrogénase putative	-2.503	-4.107
ycel	Protéine hypothétique, ORF	-4.067	b
ycfB	Protéine hypothétique, ORF	-4.267	-4.640
yciK	Oxydoréductase putative	-3.627	-4.042
yciL	Protéine hypothétique, ORF	-4.633	-4.866
yciN	Protéine hypothétique, ORF	-3.287	-3.825
yciR	Protéine hypothétique, ORF	-7.461	-7.914
ycjZ	Régulateur transcriptionnel putatif de type LYSR	-5.375	-4.159
ydaA	Protéine hypothétique, ORF	-8.225	b
ydhO	Lipoprotéine putative	-2.476	-2.065
ydjY_	Protéine hypothétique, ORF	-6.543	-6.354
yeaF	Protéine hypothétique, ORF	-3.859	-3.784
yeaH	Protéine hypothétique, ORF	-5.396	-5.921
yebA	Protéine hypothétique, ORF	-4.185	-5.262
yebK	Protéine hypothétique, ORF	-4.279	-5.745

Gène	Produit du gène	Log ₂ ratio ^a vessies/LB	Log ₂ ratio ^s reins/LB
yecC	Composante putative d'un système de transport liant l'ATP	-3.677	-3.353
yegW	Régulateur transcriptionnel putatif	-4.916	b
yehU	Protéine senseur à 2 composante putative	-5.204	b
yeiA	Oxydoréductase putative	-3.127	-5.323
yejM	Sulfatase putative	-3.609	-3.708
yfbB	Enzyme putative	-2.607	-2.649
yfgB	Protéine hypothétique, ORF	-3.028	
yfhC	Désaminase putative	-4.788	-3.126 -6.137
yfiN	Protéine hypothétique, ORF	-2.893	-4.568
yfjB	Protéine hypothétique, ORF	-3.711	-3.168
ygfT	Oxydoréductase putative, sous-unité du Fe-S	-3.692	
yghB	Protéine hypothétique, ORF	-3.965	-3.216 -6.028
ygjD	Endopeptidase O-sialoglycoprotéine putative	-3.732	-4.629
ygjR	Protéine hypothétique, ORF		-4.029
	Protéine hypothétique, ORF	-3.475 2.531	
yhaD yhbJ		-2.531	-2.872 ^b
	Protéine hypothétique, ORF	-4.561	
yhbS whoE	Protéine hypothétique, ORF	-3.120	-5.022
yheF	Protéine générale de sécrétion putative	-3.403	-2.696
yhfG	Protéine hypothétique, ORF	-2.247	-4.247
yhhS	Transporteur putatif	-2.500	-3.135
yhjD 	Protéine hypothétique, ORF	-6.752	b
yhjG	Protéine hypothétique, ORF	-5.114	-5.688
yibK	Protéine hypothétique, ORF	-3.838	-5.557
yieE	Protéine hypothétique, ORF	-4.833	
yieF	Protéine hypothétique, ORF	-4.272	-5.156
yihK	Facteur putatif liant le GTP	-3.663	-3.787
yjbK	Régulateur putatif	-4.112	-3.080
yjcG	Protéine putative de transport	-5.366	-5.325
yjdC	Protéine hypothétique, ORF	-3.984	p
yjdE	Protéine de transport des acides aminés/amines putative, cryptique	-4.143	b
yjeE	Protéine hypothétique, ORF	-5.946	-6.142
yjeK	Protéine hypothétique, ORF	-3.383	-3.658
yjfA	Protéine hypothétique, ORF	-2.509	b
yjfG	Ligase putative	-3.529	-4.879
yjfH	Protéine hypothétique, ORF	-5.214	-5.717
yjgQ	Protéine hypothétique, ORF	-5.049	-4.847
yjgR	Protéine hypothétique, ORF	-6.926	b
yjiY	Protéine putative impliquée dans la réponse de manque au carbone	-4.878	-4.611
yjjU	Protéine hypothétique, ORF	-3.908	b
ykfE	Protéine hypothétique, ORF	-5.255	-5.002
ykgJ	Ferredoxine putative	-4.563	b
ylcE	Protéine hypothétique, ORF	-2.237	-2.860
yleA	Protéine hypothétique, ORF	-3.749	-4.209
ylil	Déshydrogénase putative	-4.156	-4.718
ynfM	Protéine de transport putative	-6.192	-7.206
ynhG	Protéine hypothétique, ORF	-5.381	-5.796
yqiE	Protéine hypothétique, ORF	-5.651	-4.675
yqjE	Protéine hypothétique, ORF	-3.304	-3.974
yraO	Protéine hypothétique, ORF	-4.625	-5.147
yraP	Protéine périplasmique putative	-3.018	-3.171
ytfF	Sous-unité transmembranaire putative	-3.018 -2.747	-3.329
ytfM	Protéine hypothétique, ORF	-2.747 -4.371	-3.329
ytfQ_	Régulateur transcriptionnel putatif de type LACI	-4.371 -5.735	-8.293

^a Le \log_2 ratio réfère à la croissance in vivo relativement à la croissance in vitro (LB). ^b Signal sous le seuil de détection. Valeur P < 0,001

Annexe B

Figure B.1 Système à deux composantes de régulation de l'azote



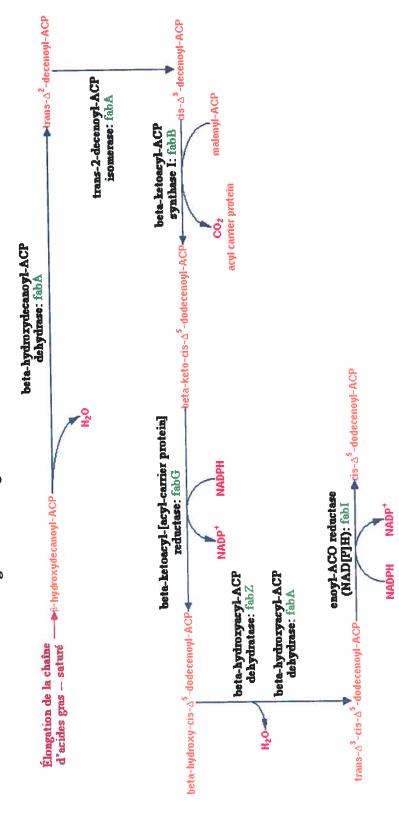
Tiré et modifié de Keseler et al. 2005. Les gènes en vert sont discutés dans le chapitre 4.

L-aspartate aspartate kinase III: lysC L-aspartyl-4-phosphate NADPHaspartate semialdéhyde déshydrogénase: asd phosphate NADP¹ L-aspartate-semialdehyde pyruvate-▶ dihydrodipicolinate synthase: dapA 2 H₂O -L-2,3-dihydrodipicolinate NAD(P)H dihydrodipicolinate reductase: dapB NAD(P)+ L-2,3,4,5-tetrahydrodipicolinate succinyl-CoA tetrahydrodipicolinate succinylase; dapD H_2O coenzyme A M-succinyl-2-amino-6-ketopimelate L-glutamate N-succinyldiaminopimelateaminotransférase: argD α-ketoglutarate M-succinyl-L,L-2,6-diaminopimelate M-succinyl-L-diaminopimelate désuccinylase: dapE succinate-L,L-diaminopimelate diaminopimelate épimérase: dapF meso-diaminopimelate diaminopimelate décarboxylase: lysA biosynthèse du peptidoglycane

Figure B.2 Voie de biosynthèse de la lysine

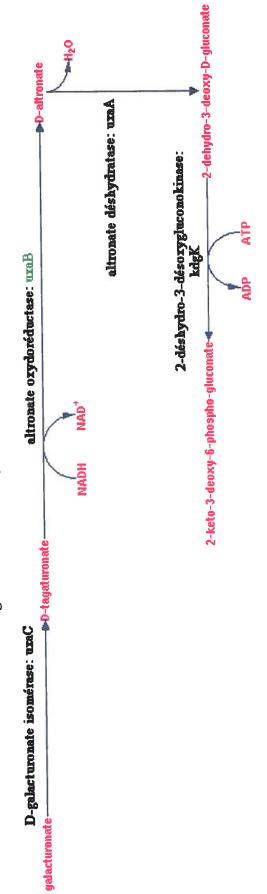
Tiré et modifié de Keseler et al. 2005. Les gènes en vert sont discutés dans le chapitre 4.

Figure B.3 Élongation des chaînes d'acides gras insaturés



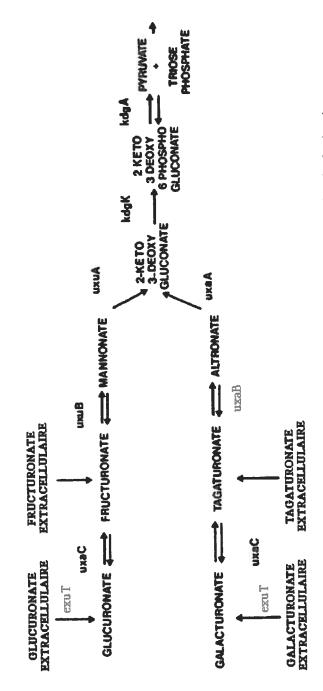
Tiré et modifié de Keseler et al. 2005. Les gènes en vert sont discutés dans le chapitre 4.

Figure B.4 Voie de dégradation du D-galacturonate



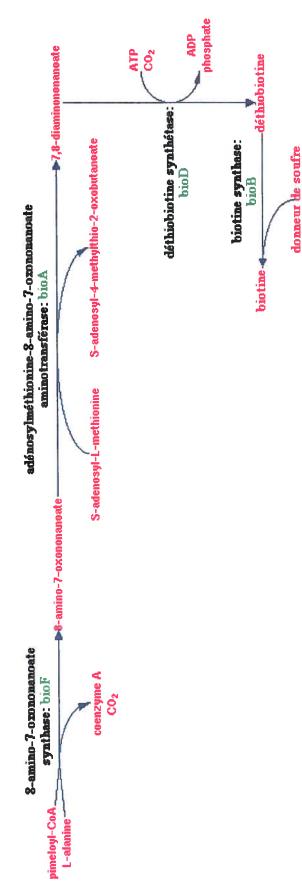
Tiré et modifié de Keseler et al. 2005. Les gènes en vert sont discutés dans le chapitre 4.

Figure B.5 Voie de dégradation des hexuronates



Tiré et modifié de Portalier et al. 1980. Les gènes en vert sont discutés dans le chapitre 4.

Figure B.6 Voie de biosynthèse de la biotine



Tiré et modifié de Keseler et al. 2005. Les gènes en vert sont discutés dans le chapitre 4.

Références

- Abaibou, H., J. Pommier, S. Benoit, G. Giordano et M. A. Mandrand-Berthelot. 1995. Expression and characterization of the *Escherichia coli fdo* locus and a possible physiological role for aerobic formate dehydrogenase. *J Bacteriol*, 177(24): 7141-9.
- Agace, W., H. Connell et C. Svanborg. 1996. Host resistance to urinary tract infection. In: H. L. T. Mobley et J. W. Warren, eds. <u>Urinary Tract Infection: Molecular Pathogenesis and Clinical Management</u>. Washington, DC. ASM Press: 221-243.
- Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser et S. J. Hultgren. 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*, 301(5629): 105-7.
- Anderson, G. G., K. W. Dodson, T. M. Hooton et S. J. Hultgren. 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Trends Microbiol*, 12(9): 424-30.
- Anderson, G. G., S. M. Martin et S. J. Hultgren. 2004. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect*, 6(12): 1094-101.
- Angelichio, M. J. et A. Camilli. 2002. In vivo expression technology. *Infect Immun*, 70(12): 6518-23.
- Bahrani-Mougeot, F. K., E. L. Buckles, C. V. Lockatell, J. R. Hebel, D. E. Johnson, C. M. Tang et M. S. Donnenberg. 2002. Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol*, 45(4): 1079-93.
- Baltes, N. et G. F. Gerlach. 2004. Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences. *Infect Immun*, 72(11): 6711-6.
- Bates, J. M., H. M. Raffi, K. Prasadan, R. Mascarenhas, Z. Laszik, N. Maeda, S. J. Hultgren et S. Kumar. 2004. Tamm-Horsfall protein knockout mice are more prone to urinary tract infection: rapid communication. *Kidney Int*, 65(3): 791-7.
- Bauer, R. J., L. Zhang, B. Foxman, A. Siitonen, M. E. Jantunen, H. Saxen et C. F. Marrs. 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-usp, iha, and iroN(E. coli). J Infect Dis, 185(10): 1521-4.

- Beinke, C., S. Laarmann, C. Wachter, H. Karch, L. Greune et M. A. Schmidt. 1998. Diffusely adhering *Escherichia coli* strains induce attaching and effacing phenotypes and secrete homologs of Esp proteins. *Infect Immun*, 66(2): 528-39.
- Bekal, S., R. Brousseau, L. Masson, G. Prefontaine, J. Fairbrother et J. Harel. 2003. Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol*, 41(5): 2113-25.
- Bergsten, G., B. Wullt et C. Svanborg. 2005. Escherichia coli, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. Int J Med Microbiol, 295(6-7): 487-502.
- Bingen, E., B. Picard, N. Brahimi, S. Mathy, P. Desjardins, J. Elion et E. Denamur. 1998. Phylogenetic analysis of *Escherichia coli* strains causing neonatal meningitis suggests horizontal gene transfer from a predominant pool of highly virulent B2 group strains. *J Infect Dis*, 177(3): 642-50.
- Blanco, J., M. Blanco, M. P. Alonso, J. E. Blanco, E. A. Gonzalez et J. I. Garabal. 1992. Characteristics of haemolytic *Escherichia coli* with particular reference to production of cytotoxic necrotizing factor type 1 (CNF1). *Res Microbiol*, 143(9): 869-78.
- Blanco, M., J. E. Blanco, M. P. Alonso, A. Mora, C. Balsalobre, F. Munoa, A. Juarez et J. Blanco. 1997. Detection of pap, sfa and afa adhesin-encoding operons in uropathogenic Escherichia coli strains: relationship with expression of adhesins and production of toxins. Res Microbiol, 148(9): 745-55.
- Boquet, P. 2000. The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from uropathogenic Escherichia coli. In: L. Emödy, T. Pal, J. Hacker et G. Blum-Oehler, eds. Genes and Proteins Underlying Microbial Urinary Tract Virulence: Basic Aspects and Applications. New York. Kluwer Academic/Plenum: 45-51.
- Bower, J. M., D. S. Eto et M. A. Mulvey. 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*, 6(1): 18-31.
- Boyd, E. F. et D. L. Hartl. 1998. Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol*, 180(5): 1159-65.
- Brickman, T. J., B. A. Ozenberger et M. A. McIntosh. 1990. Regulation of divergent transcription from the iron-responsive *fepB-entC* promoter-operator regions in *Escherichia coli*. *J Mol Biol*, 212(4): 669-82.
- Brokx, S. J., M. Ellison, T. Locke, D. Bottorff, L. Frost et J. H. Weiner. 2004. Genome-wide analysis of lipoprotein expression in *Escherichia coli* MG1655. *J Bacteriol*, 186(10): 3254-8.

- Burall, L. S., J. M. Harro, X. Li, C. V. Lockatell, S. D. Himpsl, J. R. Hebel, D. E. Johnson et H. L. Mobley. 2004. *Proteus mirabilis* genes that contribute to pathogenesis of urinary tract infection: identification of 25 signature-tagged mutants attenuated at least 100-fold. *Infect Immun*, 72(5): 2922-38.
- Bustin, S. A. 2000. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol*, 25(2): 169-93.
- Caprioli, A., V. Falbo, L. G. Roda, F. M. Ruggeri et C. Zona. 1983. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun*, 39(3): 1300-6.
- Cecchini, G., I. Schroder, R. P. Gunsalus et E. Maklashina. 2002. Succinate dehydrogenase and fumarate reductase from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1553(1-2): 140-57.
- Chang, D. E., D. J. Smalley, D. L. Tucker, M. P. Leatham, W. E. Norris, S. J. Stevenson, A. B. Anderson, J. E. Grissom, D. C. Laux, P. S. Cohen et T. Conway. 2004. Carbon nutrition of *Escherichia coli* in the mouse intestine. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(19): 7427-32.
- Chaniotaki, S., P. Giakouppi, L. S. Tzouvelekis, D. Panagiotakos, M. Kozanitou, G. Petrikkos, A. Avlami et A. C. Vatopoulos. 2004. Quinolone resistance among *Escherichia coli* strains from community-acquired urinary tract infections in Greece. *Clin Microbiol Infect*, 10(1): 75-8.
- Chepuri, V., L. Lemieux, D. C. Au et R. B. Gennis. 1990. The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome o ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the aa3-type family of cytochrome c oxidases. *J Biol Chem*, 265(19): 11185-92.
- Chiang, S. L., J. J. Mekalanos et D. W. Holden. 1999. In vivo genetic analysis of bacterial virulence. *Annu Rev Microbiol*, **53**: 129-54.
- Christoffersen, C. A., T. J. Brickman, I. Hook-Barnard et M. A. McIntosh. 2001. Regulatory architecture of the iron-regulated *fepD-ybdA* bidirectional promoter region in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **183**(6): 2059-70.
- Clermont, O., S. Bonacorsi et E. Bingen. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol*, 66(10): 4555-8.
- Clermont, O., S. Bonacorsi et E. Bingen. 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett, 196(2): 153-7.
- Conway, T. et G. K. Schoolnik. 2003. Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome. *Mol Microbiol*, 47(4): 879-89.

- Cornish, J., J. P. Lecamwasam, G. Harrison, M. A. Vanderwee et T. E. Miller. 1988. Host defence mechanisms in the bladder. II. Disruption of the layer of mucus. Br J Exp Pathol, 69(6): 759-70.
- Cortajarena, A. L., F. M. Goni et H. Ostolaza. 2003a. A receptor-binding region in *Escherichia coli* alpha-haemolysin. *J Biol Chem*, 278(21): 19159-63.
- Cortajarena, A. L., F. M. Goni et H. Ostolaza. 2003b. Asp-863 is a key residue for calcium-dependent activity of *Escherichia coli* RTX toxin alpha-haemolysin. *FEBS Lett*, **546**(2-3): 271-5.
- Crack, J., J. Green et A. J. Thomson. 2004. Mechanism of oxygen sensing by the bacterial transcription factor fumarate-nitrate reduction (FNR). *J Biol Chem*, 279(10): 9278-86.
- Cubitt, A. B., R. Heim, S. R. Adams, A. E. Boyd, L. A. Gross et R. Y. Tsien. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 20(11): 448-55.
- Cummings, C. A. et D. A. Relman. 2000. Using DNA microarrays to study host-microbe interactions. *Emerg Infect Dis*, 6(5): 513-25.
- Daigle, F., J. Harel, J. M. Fairbrother et P. Lebel. 1994. Expression and detection of pap-, sfa-, and afa-encoded fimbrial adhesin systems among uropathogenic Escherichia coli. Can J Microbiol, 40(4): 286-91.
- Daigle, F., J. E. Graham et R. Curtiss, 3rd. 2001. Identification of Salmonella typhi genes expressed within macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). Mol Microbiol, 41(5): 1211-22.
- Daigle, F., J. Y. Hou et J. E. Clark-Curtiss. 2002. Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Methods Enzymol*, 358: 108-22.
- Damerau, K. et A. C. St John. 1993. Role of Clp protease subunits in degradation of carbon starvation proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 175(1): 53-63.
- Davis, J. M., S. B. Rasmussen et A. D. O'Brien. 2005. Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infect Immun*, 73(9): 5301-10.
- de Saizieu, A., C. Gardes, N. Flint, C. Wagner, M. Kamber, T. J. Mitchell, W. Keck, K. E. Amrein et R. Lange. 2000. Microarray-based identification of a novel Streptococcus pneumoniae regulon controlled by an autoinduced peptide. J. Bacteriol, 182(17): 4696-703.

- Dharmadi, Y. et R. Gonzalez. 2004. DNA microarrays: experimental issues, data analysis, and application to bacterial systems. *Biotechnol Prog*, 20(5): 1309-24.
- **Dobrindt**, U. 2005. (Pato-)Genomics of *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol, 295: 357-371.
- Donnenberg, M. S. et R. A. Welch. 1996. Virulence determinants of uropathogenic Escherichia coli. In: H. L. T. Mobley et J. W. Warren, eds. <u>Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management</u>. Washington, D. C. ASM Press: 135-174.
- **Dozois, C. M. et R. Curtiss, 3rd.** 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Vet Res*, **30**(2-3): 157-79.
- Dozois, C. M., F. Daigle et R. Curtiss, 3rd. 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(1): 247-52.
- Draper, D. W., H. N. Bethea et Y. W. He. 2005. Toll-like receptor 2-dependent and independent activation of macrophages by group B streptococci. *Immunol Lett*.
- Eaves, D. J., J. Grove, W. Staudenmann, P. James, R. K. Poole, S. A. White, I. Griffiths et J. A. Cole. 1998. Involvement of products of the *nrfEFG* genes in the covalent attachment of haem c to a novel cysteine-lysine motif in the cytochrome c552 nitrite reductase from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 28(1): 205-16.
- Emody, L., M. Kerenyi et G. Nagy. 2003. Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli. Int J Antimicrob Agents, 22 Suppl 2: 29-33.
- Faucher, S. P., R. Curtiss, 3rd et F. Daigle. 2005. Selective capture of Salmonella enterica serovar typhi genes expressed in macrophages that are absent from the Salmonella enterica serovar Typhimurium genome. Infect Immun, 73(8): 5217-21.
- Faucher, S. P., S. Porwollik, C. M. Dozois, M. McClelland et F. Daigle. 2006. Transcriptome of Salmonella enterica serovar Typhi within macrophages revealed through the selective capture of transcribed sequences. Proc Natl Acad Sci U S A, 103(6): 1906-11.
- Feria, C., J. Machado, J. Duarte Correia, J. Goncalves et W. Gaastra. 2001. Distribution of papG alleles among uropathogenic Escherichia coli isolated from different species. FEMS Microbiol Lett, 202(2): 205-8.
- Fields, P. I., R. V. Swanson, C. G. Haidaris et F. Heffron. 1986. Mutants of Salmonella typhimurium that cannot survive within the macrophage are avirulent. Proc Natl Acad Sci USA, 83(14): 5189-93.

- Finer, G. et D. Landau. 2004. Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis*, 4(10): 631-5.
- Fiorentini, C., A. Fabbri, G. Flatau, G. Donelli, P. Matarrese, E. Lemichez, L. Falzano et P. Boquet. 1997. Escherichia coli cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1), a toxin that activates the Rho GTPase. J Biol Chem, 272(31): 19532-7.
- Foxman, B., L. Zhang, K. Palin, P. Tallman et C. F. Marrs. 1995. Bacterial virulence characteristics of *Escherichia coli* isolates from first-time urinary tract infection. *J Infect Dis*, 171(6): 1514-21.
- Gerdes, S. Y., M. D. Scholle, J. W. Campbell, G. Balazsi, E. Ravasz, M. D. Daugherty, A. L. Somera, N. C. Kyrpides, I. Anderson, M. S. Gelfand, A. Bhattacharya, V. Kapatral, M. D'Souza, M. V. Baev, Y. Grechkin, F. Mseeh, M. Y. Fonstein, R. Overbeek, A. L. Barabasi, Z. N. Oltvai et A. L. Osterman. 2003. Experimental determination and system level analysis of essential genes in Escherichia coli MG1655. J Bacteriol, 185(19): 5673-84.
- Gerhold, D., T. Rushmore et C. T. Caskey. 1999. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends Biochem Sci*, 24(5): 168-73.
- Ginzinger, D. G. 2002. Gene quantification using real-time quantitative PCR: an emerging technology hits the mainstream. *Exp Hematol*, 30(6): 503-12.
- Goluszko, P., S. L. Moseley, L. D. Truong, A. Kaul, J. R. Williford, R. Selvarangan, S. Nowicki et B. Nowicki. 1997. Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75:K5:H-bearing Dr fimbriae: mutation in the dra region prevented tubulointerstitial nephritis. *J Clin Invest*, 99(7): 1662-72.
- Goluszko, P., D. Niesel, B. Nowicki, R. Selvarangan, S. Nowicki, A. Hart, E. Pawelczyk, M. Das, P. Urvil et R. Hasan. 2001. Dr operon-associated invasiveness of *Escherichia coli* from pregnant patients with pyelonephritis. *Infect Immun*, 69(7): 4678-80.
- Gorbacheva, V. Y., G. Faundez, H. P. Godfrey et F. C. Cabello. 2001. Restricted growth of *ent*(-) and *tonB* mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhi in human Mono Mac 6 monocytic cells. *FEMS Microbiol Lett*, 196(1): 7-11.
- Goullet, P., B. Picard, M. Contrepois, J. De Rycke et J. Barnouin. 1994. Correlation between esterase electrophoretic polymorphism and virulence-associated traits in extra-intestinal invasive strains of *Escherichia coli*. *Epidemiol Infect*, 112(1): 51-62.
- Graham, J. E. et J. E. Clark-Curtiss. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(20): 11554-9.

- Graham, J. E., R. M. Peek, Jr., U. Krishna et T. L. Cover. 2002. Global analysis of *Helicobacter pylori* gene expression in human gastric mucosa. *Gastroenterology*, 123(5): 1637-48.
- Grove, J., S. Busby et J. Cole. 1996. The role of the genes nrfEFG and ccmFH in cytochrome c biosynthesis in Escherichia coli. Mol Gen Genet, 252(3): 332-41.
- Gunther, I. N., J. A. Snyder, V. Lockatell, I. Blomfield, D. E. Johnson et H. L. Mobley. 2002. Assessment of virulence of uropathogenic *Escherichia coli* type 1 fimbrial mutants in which the invertible element is phase-locked on or off. *Infect Immun*, 70(7): 3344-54.
- Gupta, K., D. Scholes et W. E. Stamm. 1999. Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women. *Jama*, 281(8): 736-8.
- Guyer, D. M., I. R. Henderson, J. P. Nataro et H. L. Mobley. 2000. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic Escherichia coli. Mol Microbiol, 38(1): 53-66.
- Guyer, D. M., S. Radulovic, F. E. Jones et H. L. Mobley. 2002. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun*, 70(8): 4539-46.
- Hacker, J., L. Bender, M. Ott, J. Wingender, B. Lund, R. Marre et W. Goebel. 1990. Deletions of chromosomal regions coding for fimbriae and hemolysins occur in vitro and in vivo in various extraintestinal *Escherichia coli* isolates. *Microb Pathog*, 8(3): 213-25.
- Hacker, J., H. Kestler, H. Hoschutzky, K. Jann, F. Lottspeich et T. K. Korhonen. 1993. Cloning and characterization of the S fimbrial adhesin II complex of an *Escherichia coli* O18:K1 meningitis isolate. *Infect Immun*, **61**(2): 544-50.
- Hacker, J. 2000. Urinary tract infection: from basic science to clinical application. In: L. Emödy, T. Pal, J. Hacker et G. Blum-Oehler, eds. Genes and Proteins Underlying Microbial Urinary Tract Virulence: Basic Aspects and Applications. New York. Kluwer Academic/Plenum: 1-9.
- Hacker, J. et J. B. Kaper. 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol*, 54: 641-79.
- Hagberg, L., I. Engberg, R. Freter, J. Lam, S. Olling et C. Svanborg Eden. 1983.

 Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect Immun*, 40(1): 273-83.

- Hagberg, L., R. Hull, S. Hull, J. R. McGhee, S. M. Michalek et C. Svanborg Eden. 1984. Difference in susceptibility to gram-negative urinary tract infection between C3H/HeJ and C3H/HeN mice. *Infect Immun*, 46(3): 839-44.
- Han, Y., D. Zhou, X. Pang, L. Zhang, Y. Song, Z. Tong, J. Bao, E. Dai, J. Wang, Z. Guo, J. Zhai, Z. Du, X. Wang, P. Huang et R. Yang. 2005. Comparative transcriptome analysis of Yersinia pestis in response to hyperosmotic and high-salinity stress. Res Microbiol, 156(3): 403-15.
- Handfield, M. et R. C. Levesque. 1999. Strategies for isolation of in vivo expressed genes from bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 23(1): 69-91.
- Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch et G. Winkelmann. 2003. Salmochelins, siderophores of Salmonella enterica and uropathogenic Escherichia coli strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. Proc Natl Acad Sci U S A, 100(7): 3677-82.
- Hart, A., B. J. Nowicki, B. Reisner, E. Pawelczyk, P. Goluszko, P. Urvil, G. Anderson et S. Nowicki. 2001. Ampicillin-resistant *Escherichia coli* in gestational pyelonephritis: increased occurrence and association with the colonization factor Dr adhesin. *J Infect Dis*, 183(10): 1526-9.
- Hautefort, I. et J. C. Hinton. 2000. Measurement of bacterial gene expression in vivo. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355(1397): 601-11.
- Haydel, S. E., W. H. Benjamin, Jr., N. E. Dunlap et J. E. Clark-Curtiss. 2002. Expression, autoregulation, and DNA binding properties of the *Mycobacterium tuberculosis* TrcR response regulator. *J Bacteriol*, **184**(8): 2192-203.
- Haydel, S. E. et J. E. Clark-Curtiss. 2004. Global expression analysis of two-component system regulator genes during *Mycobacterium tuberculosis* growth in human macrophages. *FEMS Microbiol Lett*, **236**(2): 341-7.
- Hedges, S., M. Svensson et C. Svanborg. 1992. Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro. Infect Immun, 60(4): 1295-301.
- Heimer, S. R., D. A. Rasko, C. V. Lockatell, D. E. Johnson et H. L. Mobley. 2004. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun*, 72(1): 593-7.
- Heithoff, D. M., C. P. Conner, P. C. Hanna, S. M. Julio, U. Hentschel et M. J. Mahan. 1997. Bacterial infection as assessed by in vivo gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(3): 934-9.

- Henderson, D. P. et S. M. Payne. 1994. Vibrio cholerae iron transport systems: roles of heme and siderophore iron transport in virulence and identification of a gene associated with multiple iron transport systems. Infect Immun, 62(11): 5120-5.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia et J. P. Nataro. 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiol*, 6(9): 370-8.
- Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez et D. Ala'Aldeen. 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68(4): 692-744.
- Hensel, M., J. E. Shea, C. Gleeson, M. D. Jones, E. Dalton et D. W. Holden. 1995. Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*, 269(5222): 400-3.
- Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye et T. S. Whittam. 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 172(11): 6175-81.
- Higuchi, R., G. Dollinger, P. S. Walsh et R. Griffith. 1992. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology (N Y)*, 10(4): 413-7.
- Hinata, N., T. Shirakawa, H. Okada, K. Shigemura, S. Kamidono et A. Gotoh. 2004. Quantitative detection of Escherichia coli from urine of patients with bacteriuria by real-time PCR. *Mol Diagn*, 8(3): 179-84.
- Hinton, J. C., I. Hautefort, S. Eriksson, A. Thompson et M. Rhen. 2004. Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr Opin Microbiol*, 7(3): 277-82.
- Hopkins, W. J., J. A. Hall, B. P. Conway et D. T. Uehling. 1995. Induction of urinary tract infection by intraurethral inoculation with *Escherichia coli*: refining the murine model. *J Infect Dis*, 171(2): 462-5.
- Hou, J. Y., J. E. Graham et J. E. Clark-Curtiss. 2002. *Mycobacterium avium* genes expressed during growth in human macrophages detected by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Infect Immun*, 70(7): 3714-26.
- Ingledew, W. J. et R. K. Poole. 1984. The respiratory chains of *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*, 48(3): 222-71.
- Iobbi-Nivol, C., H. Crooke, L. Griffiths, J. Grove, H. Hussain, J. Pommier, V. Mejean et J. A. Cole. 1994. A reassessment of the range of c-type cytochromes synthesized by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol Lett*, 119(1-2): 89-94.

- Jacobi, A., R. Rossmann et A. Bock. 1992. The hyp operon gene products are required for the maturation of catalytically active hydrogenase isoenzymes in *Escherichia coli*. Arch Microbiol, **158**(6): 444-51.
- Jarosik, G. P., J. D. Sanders, L. D. Cope, U. Muller-Eberhard et E. J. Hansen. 1994. A functional tonB gene is required for both utilization of heme and virulence expression by *Haemophilus influenzae* type b. *Infect Immun*, 62(6): 2470-7.
- Jin, H. Y., K. H. Tao, Y. X. Li, F. Q. Li et S. Q. Li. 2005. Microarray analysis of Escherichia coli O157:H7. World J Gastroenterol, 11(37): 5811-5.
- Johnson, D. E. et R. G. Russel. 1996. Animal models of urinary tract infection. In: H. L. T. Mobley et J. W. Warren, eds. <u>Urinary tract infection: Molecular Pathogenesis</u> and Clinical Management. Washington, DC. ASM Press: 377-403.
- Johnson, J. R. 1991. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev.*, 4(1): 80-128.
- Johnson, J. R. et J. J. Brown. 1996. Defining inoculation conditions for the mouse model of ascending urinary tract infection that avoid immediate vesicoureteral reflux yet produce renal and bladder infection. *J Infect Dis*, 173(3): 746-9.
- Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski et A. L. Stell. 2001. Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. J. Infect Dis., 183(1): 78-88.
- Johnson, J. R., S. Jelacic, L. M. Schoening, C. Clabots, N. Shaikh, H. L. Mobley et P. I. Tarr. 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun*, 73(2): 965-71.
- Johnson, J. R. et T. A. Russo. 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, **295**(6-7): 383-404.
- Jordan, J. A. et M. B. Durso. 2005. Real-time polymerase chain reaction for detecting bacterial DNA directly from blood of neonates being evaluated for sepsis. *J Mol Diagn*, 7(5): 575-81.
- Justice, S. S., C. Hung, J. A. Theriot, D. A. Fletcher, G. G. Anderson, M. J. Footer et S. J. Hultgren. 2004. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101(5): 1333-8.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro et H. L. Mobley. 2004. Pathogenic Escherichia coli. Nat Rev Microbiol, 2(2): 123-40.

- Kato-Maeda, M., Q. Gao et P. M. Small. 2001. Microarray analysis of pathogens and their interaction with hosts. *Cell Microbiol*, 3(11): 713-9.
- Kau, A. L., D. A. Hunstad et S. J. Hultgren. 2005. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr Opin Microbiol*, 8(1): 54-9.
- Keseler, I. M., J. Collado-Vides, S. Gama-Castro, J. Ingraham, S. Paley, I. T. Paulsen, M. Peralta-Gil et P. D. Karp. 2005. EcoCyc: a comprehensive database resource for *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 33(Database issue): D334-7.
- Klumpp, D. J., A. C. Weiser, S. Sengupta, S. G. Forrestal, R. A. Batler et A. J. Schaeffer. 2001. Uropathogenic *Escherichia coli* potentiates type 1 pilus-induced apoptosis by suppressing NF-kappaB. *Infect Immun*, 69(11): 6689-95.
- Knodler, L. A., A. Bestor, C. Ma, I. Hansen-Wester, M. Hensel, B. A. Vallance et O. Steele-Mortimer. 2005. Cloning vectors and fluorescent proteins can significantly inhibit Salmonella enterica virulence in both epithelial cells and macrophages: implications for bacterial pathogenesis studies. Infect Immun, 73(10): 7027-31.
- Kroh, H. E. et L. D. Simon. 1990. The ClpP component of Clp protease is the sigma 32-dependent heat shock protein F21.5. *J Bacteriol*, 172(10): 6026-34.
- Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, 3rd, J. D. Dubreuil et J. Harel. 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun*, 73(7): 4138-45.
- Landraud, L., M. Gauthier, T. Fosse et P. Boquet. 2000. Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol*, 30(3): 213-6.
- Landraud, L., C. Pulcini, P. Gounon, G. Flatau, P. Boquet et E. Lemichez. 2004. E. coli CNF1 toxin: a two-in-one system for host-cell invasion. Int J Med Microbiol, 293(7-8): 513-8.
- Lavrrar, J. L., C. A. Christoffersen et M. A. McIntosh. 2002. Fur-DNA interactions at the bidirectional *fepDGC-entS* promoter region in Escherichia coli. *J Mol Biol*, 322(5): 983-95.
- Le Bouguenec, C. 2005. Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol, 295(6-7): 471-8.
- Lecointre, G., L. Rachdi, P. Darlu et E. Denamur. 1998. Escherichia coli molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol Biol Evol, 15(12): 1685-95.

- Leonardo, M. R., P. R. Cunningham et D. P. Clark. 1993. Anaerobic regulation of the adhE gene, encoding the fermentative alcohol dehydrogenase of Escherichia coli. J Bacteriol, 175(3): 870-8.
- Lesniak, J., W. A. Barton et D. B. Nikolov. 2003. Structural and functional features of the *Escherichia coli* hydroperoxide resistance protein OsmC. *Protein Sci*, 12(12): 2838-43.
- Leverton, L. Q. et J. B. Kaper. 2005. Temporal expression of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence genes in an in vitro model of infection. *Infect Immun*, 73(2): 1034-43.
- Li, G., C. Laturnus, C. Ewers et L. H. Wieler. 2005. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun*, 73(5): 2818-27.
- Lim, J. K., N. W. t. Gunther, H. Zhao, D. E. Johnson, S. K. Keay et H. L. Mobley. 1998. In vivo phase variation of *Escherichia coli* type 1 fimbrial genes in women with urinary tract infection. *Infect Immun*, 66(7): 3303-10.
- Lindroos, H. L., A. Mira, D. Repsilber, O. Vinnere, K. Naslund, M. Dehio, C. Dehio et S. G. Andersson. 2005. Characterization of the genome composition of Bartonella koehlerae by microarray comparative genomic hybridization profiling. *J Bacteriol*, 187(17): 6155-65.
- Liu, S., J. E. Graham, L. Bigelow, P. D. Morse, 2nd et B. J. Wilkinson. 2002. Identification of *Listeria monocytogenes* genes expressed in response to growth at low temperature. *Appl Environ Microbiol*, 68(4): 1697-705.
- Lockhart, D. J. et E. A. Winzeler. 2000. Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature*, 405(6788): 827-36.
- Lucchini, S., A. Thompson et J. C. Hinton. 2001. Microarrays for microbiologists. *Microbiology*, 147(Pt 6): 1403-14.
- Lundberg, J. O., I. Ehren, O. Jansson, J. Adolfsson, J. M. Lundberg, E. Weitzberg, K. Alving et N. P. Wiklund. 1996. Elevated nitric oxide in the urinary bladder in infectious and noninfectious cystitis. *Urology*, 48(5): 700-2.
- Mahan, M. J., J. M. Slauch et J. J. Mekalanos. 1993. Selection of bacterial virulence genes that are specifically induced in host tissues. *Science*, 259(5095): 686-8.
- Marrs, C. F., L. Zhang et B. Foxman. 2005. Escherichia coli mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol Lett.

- Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner et S. J. Hultgren. 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J*, 19(12): 2803-12.
- McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper et S. C. Andrews. 2003. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem*, 278(32): 29478-86.
- Membrillo-Hernandez, J., P. Echave, E. Cabiscol, J. Tamarit, J. Ros et E. C. Lin. 2000. Evolution of the *adhE* gene product of *Escherichia coli* from a functional reductase to a dehydrogenase. Genetic and biochemical studies of the mutant proteins. *J Biol Chem*, 275(43): 33869-75.
- Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockatell, B. D. Jones et J. W. Warren. 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun*, 58(5): 1281-9.
- Montgomerie, J. Z., A. Bindereif, J. B. Neilands, G. M. Kalmanson et L. B. Guze. 1984. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infect Immun*, 46(3): 835-8.
- Moreau, Y., S. Aerts, B. De Moor, B. De Strooper et M. Dabrowski. 2003. Comparison and meta-analysis of microarray data: from the bench to the computer desk. *Trends Genet*, 19(10): 570-7.
- Morrow, B. J., J. E. Graham et R. Curtiss, 3rd. 1999. Genomic subtractive hybridization and selective capture of transcribed sequences identify a novel Salmonella typhimurium fimbrial operon and putative transcriptional regulator that are absent from the Salmonella typhi genome. Infect Immun, 67(10): 5106-16.
- Mulvey, M. A., Y. S. Lopez-Boado, C. L. Wilson, R. Roth, W. C. Parks, J. Heuser et S. J. Hultgren. 1998. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 282(5393): 1494-7.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling, J. J. Martinez et S. J. Hultgren. 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(16): 8829-35.
- Mulvey, M. A. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol, 4(5): 257-71.
- Mysorekar, I. U., M. A. Mulvey, S. J. Hultgren et J. I. Gordon. 2002. Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 277(9): 7412-9.

- Nair, S. et S. E. Finkel. 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. *J Bacteriol*, 186(13): 4192-8.
- Nataro, J. P., D. Yikang, D. Yingkang et K. Walker. 1994. AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli. J Bacteriol*, 176(15): 4691-9.
- Negre, V. L., S. Bonacorsi, S. Schubert, P. Bidet, X. Nassif et E. Bingen. 2004. The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect Immun*, 72(2): 1216-20.
- Neidhardt, F. C. et H. E. Umbarger. 1996. <u>Escherichia coli and Salmonella typhimurium</u>: Cellular and Molecular Biology. Washington, D.C. ASM Press. p.13.
- Nesin, M., J. R. Lupski, P. Svec et G. N. Godson. 1987. Possible new genes as revealed by molecular analysis of a 5-kb *Escherichia coli* chromosomal region 5' to the *rpsU-dnaG-rpoD* macromolecular-synthesis operon. *Gene*, 51(2-3): 149-61.
- Noller, A. C., M. C. McEllistrem, O. C. Stine, J. G. Morris, Jr., D. J. Boxrud, B. Dixon et L. H. Harrison. 2003. Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol*, 41(2): 675-9.
- Nowicki, B., R. Selvarangan et S. Nowicki. 2001. Family of *Escherichia coli* Dr adhesins: decay-accelerating factor receptor recognition and invasiveness. *J Infect Dis*, 183 Suppl 1: S24-7.
- Nowicki, B. J. 1996. *In vitro* models for the study of uropathogens. In: H. L. T. Mobley et J. W. Warren, eds. <u>Urinary Tract Infection: Molecular Pathogenesis and Clinical Management</u>. Washington, DC. ASM Press: 341-376.
- O'Brien, I. G. et F. Gibson. 1970. The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 215(2): 393-402.
- Ochman, H. et R. K. Selander. 1984a. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol*, 157(2): 690-3.
- Ochman, H. et R. K. Selander. 1984b. Evidence for clonal population structure in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA, 81(1): 198-201.
- Oliva, I., G. Zuffi, D. Barile, G. Orsini, G. Tonon, L. De Gioia et D. Ghisotti. 2004. Characterization of *Escherichia coli* uridine phosphorylase by single-site mutagenesis. *J Biochem (Tokyo)*, 135(4): 495-9.

- Otsuka, A. J., M. R. Buoncristiani, P. K. Howard, J. Flamm, C. Johnson, R. Yamamoto, K. Uchida, C. Cook, J. Ruppert et J. Matsuzaki. 1988. The *Escherichia coli* biotin biosynthetic enzyme sequences predicted from the nucleotide sequence of the *bio* operon. *J Biol Chem*, 263(36): 19577-85.
- Parham, N. J., U. Srinivasan, M. Desvaux, B. Foxman, C. F. Marrs et I. R. Henderson. 2004. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*, **230**(1): 73-83.
- Park, S. J., P. A. Cotter et R. P. Gunsalus. 1995. Regulation of malate dehydrogenase (mdh) gene expression in *Escherichia coli* in response to oxygen, carbon, and heme availability. *J Bacteriol*, 177(22): 6652-6.
- Parreira, V. R. et C. L. Gyles. 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun*, 71(9): 5087-96.
- Patten, C. L., M. G. Kirchhof, M. R. Schertzberg, R. A. Morton et H. E. Schellhorn. 2004. Microarray analysis of RpoS-mediated gene expression in *Escherichia coli* K-12. *Mol Genet Genomics*, 272(5): 580-91.
- Pease, A. C., D. Solas, E. J. Sullivan, M. T. Cronin, C. P. Holmes et S. P. Fodor. 1994. Light-generated oligonucleotide arrays for rapid DNA sequence analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(11): 5022-6.
- Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion et E. Denamur. 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun*, 67(2): 546-53.
- Picard, C., A. Puel, M. Bonnet, C. L. Ku, J. Bustamante, K. Yang, C. Soudais, S. Dupuis, J. Feinberg, C. Fieschi, C. Elbim, R. Hitchcock, D. Lammas, G. Davies, A. Al-Ghonaium, H. Al-Rayes, S. Al-Jumaah, S. Al-Hajjar, I. Z. Al-Mohsen, H. H. Frayha, R. Rucker, T. R. Hawn, A. Aderem, H. Tufenkeji, S. Haraguchi, N. K. Day, R. A. Good, M. A. Gougerot-Pocidalo, A. Ozinsky et J. L. Casanova. 2003. Pyogenic bacterial infections in humans with IRAK-4 deficiency. Science, 299(5615): 2076-9.
- Poitras, E. et A. Houde. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. Reviews in Biology and Biotechnology, 2(2): 2-11.
- Poljakovic, M., M. L. Svensson, C. Svanborg, K. Johansson, B. Larsson et K. Persson. 2001. *Escherichia coli*-induced inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase expression in the mouse bladder and kidney. *Kidney Int*, 59(3): 893-904.
- Pollack, J. R. et J. B. Neilands. 1970. Enterobactin, an iron transport compound from Salmonella typhimurium. Biochem Biophys Res Commun, 38(5): 989-92.

- **Portalier, R., J. Robert-Baudouy et F. Stoeber**. 1980. Regulation of *Escherichia coli* K-12 hexuronate system genes: *exu* regulon. *J Bacteriol*, **143**(3): 1095-107.
- Porwollik, S., E. F. Boyd, C. Choy, P. Cheng, L. Florea, E. Proctor et M. McClelland. 2004. Characterization of *Salmonella enterica* subspecies I genovars by use of microarrays. *J Bacteriol*, 186(17): 5883-98.
- Prescott, L., J. P. Harley et D. A. Klein. 1995. Microbiologie. 2e édition. Bruxelles. DeBoeck Université. 1014 pages.
- Pruss, B. M., J. M. Nelms, C. Park et A. J. Wolfe. 1994. Mutations in NADH: ubiquinone oxidoreductase of *Escherichia coli* affect growth on mixed amino acids. *J Bacteriol*, 176(8): 2143-50.
- Pupo, G. M., D. K. Karaolis, R. Lan et P. R. Reeves. 1997. Evolutionary relationships among pathogenic and nonpathogenic *Escherichia coli* strains inferred from multilocus enzyme electrophoresis and *mdh* sequence studies. *Infect Immun*, 65(7): 2685-92.
- Rang, C., J. E. Galen, J. B. Kaper et L. Chao. 2003. Fitness cost of the green fluorescent protein in gastrointestinal bacteria. *Can J Microbiol*, 49(9): 531-7.
- Reaney, S. K., C. Begg, S. J. Bungard et J. R. Guest. 1993. Identification of the L-tartrate dehydratase genes (*ttdA* and *ttdB*) of *Escherichia coli* and evolutionary relationship with the class I fumarase genes. *J Gen Microbiol*, 139(7): 1523-30.
- Redford, P., P. L. Roesch et R. A. Welch. 2003. DegS is necessary for virulence and is among extraintestinal *Escherichia coli* genes induced in murine peritonitis. *Infect Immun*, 71(6): 3088-96.
- Reeves, S. A., A. G. Torres et S. M. Payne. 2000. TonB is required for intracellular growth and virulence of *Shigella dysenteriae*. *Infect Immun*, 68(11): 6329-36.
- Reiling, N., C. Holscher, A. Fehrenbach, S. Kroger, C. J. Kirschning, S. Goyert et S. Ehlers. 2002. Cutting edge: Toll-like receptor (TLR)2- and TLR4-mediated pathogen recognition in resistance to airborne infection with *Mycobacterium tuberculosis*. J Immunol, 169(7): 3480-4.
- Reissmann, S., E. Hochleitner, H. Wang, A. Paschos, F. Lottspeich, R. S. Glass et A. Bock. 2003. Taming of a poison: biosynthesis of the NiFe-hydrogenase cyanide ligands. *Science*, 299(5609): 1067-70.
- Riegman, N., R. Kusters, H. Van Veggel, H. Bergmans, P. Van Bergen en Henegouwen, J. Hacker et I. Van Die. 1990. F1C fimbriae of a uropathogenic *Escherichia coli* strain: genetic and functional organization of the *foc* gene cluster and identification of minor subunits. *J Bacteriol*, 172(2): 1114-20.

- Rippere-Lampe, K. E., M. Lang, H. Ceri, M. Olson, H. A. Lockman et A. D. O'Brien. 2001a. Cytotoxic necrotizing factor type 1-positive *Escherichia coli* causes increased inflammation and tissue damage to the prostate in a rat prostatitis model. *Infect Immun*, 69(10): 6515-9.
- Rippere-Lampe, K. E., A. D. O'Brien, R. Conran et H. A. Lockman. 2001b. Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (cnf1) attenuates the virulence of uropathogenic Escherichia coli. Infect Immun, 69(6): 3954-64.
- Roberts, J. A., B. I. Marklund, D. Ilver, D. Haslam, M. B. Kaack, G. Baskin, M. Louis, R. Mollby, J. Winberg et S. Normark. 1994. The Gal(alpha 1-4)Galspecific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 91(25): 11889-93.
- Roesch, P. L., P. Redford, S. Batchelet, R. L. Moritz, S. Pellett, B. J. Haugen, F. R. Blattner et R. A. Welch. 2003. Uropathogenic *Escherichia coli* use d-serine deaminase to modulate infection of the murine urinary tract. *Mol Microbiol*, 49(1): 55-67.
- Roos, V., G. C. Ulett, M. A. Schembri et P. Klemm. 2006. The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. *Infect Immun*, 74(1): 615-24.
- Russo, T. A., Y. Liang et A. S. Cross. 1994. The presence of K54 capsular polysaccharide increases the pathogenicity of *Escherichia coli in vivo*. *J Infect Dis*, 169(1): 112-8.
- Russo, T. A., J. J. Brown, S. T. Jodush et J. R. Johnson. 1996a. The O4 specific antigen moiety of lipopolysaccharide but not the K54 group 2 capsule is important for urovirulence of an extraintestinal isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 64(6): 2343-8.
- Russo, T. A., S. T. Jodush, J. J. Brown et J. R. Johnson. 1996b. Identification of two previously unrecognized genes (guaA and argC) important for uropathogenesis. *Mol Microbiol*, 22(2): 217-29.
- Russo, T. A., U. B. Carlino, A. Mong et S. T. Jodush. 1999. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infect Immun*, 67(10): 5306-14.
- Russo, T. A., U. B. Carlino et J. R. Johnson. 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 69(10): 6209-16.
- Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard et J. R. Johnson. 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is

- a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 70(12): 7156-60.
- Russo, T. A. et J. R. Johnson. 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect*, 5(5): 449-56.
- Saemann, M. D., T. Weichhart, W. H. Horl et G. J. Zlabinger. 2005. Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection. *Eur J Clin Invest*, 35(4): 227-35.
- Salvadori, M. R., T. Yano, H. E. Carvalho, V. R. Parreira et C. L. Gyles. 2001. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis*, 45(1): 43-51.
- Salyers, A. A. et D. D. Whitt. 2002. <u>Bacterial pathogenesis: A molecular approach</u>. 2. Washington. ASM Press. 539.
- Sargent, F., S. P. Ballantine, P. A. Rugman, T. Palmer et D. H. Boxer. 1998. Reassignment of the gene encoding the *Escherichia coli* hydrogenase 2 small subunit, identification of a soluble precursor of the small subunit in a *hypB* mutant. *Eur J Biochem*, 255(3): 746-54.
- Schaeffer, A. J., N. Rajan, Q. Cao, B. E. Anderson, D. L. Pruden, J. Sensibar et J. L. Duncan. 2001. Host pathogenesis in urinary tract infections. *Int J Antimicrob Agents*, 17(4): 245-51.
- Schembri, M. A., G. Christiansen et P. Klemm. 2001. FimH-mediated autoaggregation of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 41(6): 1419-30.
- Schembri, M. A. et P. Klemm. 2001. Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel *fimH* variants and ramifications for virulence. *Infect Immun*, 69(3): 1322-8.
- Schilling, J. D., M. A. Mulvey, C. D. Vincent, R. G. Lorenz et S. J. Hultgren. 2001. Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *J Immunol*, 166(2): 1148-55.
- Schilling, J. D., S. M. Martin, C. S. Hung, R. G. Lorenz et S. J. Hultgren. 2003. Toll-like receptor 4 on stromal and hematopoietic cells mediates innate resistance to uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(7): 4203-8.
- Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer et M. W. Reed. 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*, 285(2): 194-204.

- Seliger, S. S., A. R. Mey, A. M. Valle et S. M. Payne. 2001. The two TonB systems of *Vibrio cholerae*: redundant and specific functions. *Mol Microbiol*, 39(3): 801-12.
- Selvarangan, R., P. Goluszko, V. Popov, J. Singhal, T. Pham, D. M. Lublin, S. Nowicki et B. Nowicki. 2000. Role of decay-accelerating factor domains and anchorage in internalization of Dr-fimbriated *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 68(3): 1391-9.
- Selvarangan, R., P. Goluszko, J. Singhal, C. Carnoy, S. Moseley, B. Hudson, S. Nowicki et B. Nowicki. 2004. Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence. *Infect Immun*, 72(8): 4827-35.
- Semret, M., G. Zhai, S. Mostowy, C. Cleto, D. Alexander, G. Cangelosi, D. Cousins, D. M. Collins, D. van Soolingen et M. A. Behr. 2004. Extensive genomic polymorphism within *Mycobacterium avium*. *J Bacteriol*, 186(18): 6332-4.
- Shalel-Levanon, S., K. Y. San et G. N. Bennett. 2005. Effect of ArcA and FNR on the expression of genes related to the oxygen regulation and the glycolysis pathway in *Escherichia coli* under microaerobic growth conditions. *Biotechnol Bioeng*, 92(2): 147-59.
- Shea, J. E., J. D. Santangelo et R. G. Feldman. 2000. Signature-tagged mutagenesis in the identification of virulence genes in pathogens. *Curr Opin Microbiol*, 3(5): 451-8.
- Shelburne, S. A. et J. M. Musser. 2004. Virulence gene expression in vivo. *Curr Opin Microbiol*, 7(3): 283-9.
- Shoemaker, D. D. et P. S. Linsley. 2002. Recent developments in DNA microarrays. *Curr Opin Microbiol*, 5(3): 334-7.
- Slauch, J. M., M. J. Mahan et J. J. Mekalanos. 1994a. In vivo expression technology for selection of bacterial genes specifically induced in host tissues. *Methods Enzymol*, 235: 481-92.
- Slauch, J. M., M. J. Mahan et J. J. Mekalanos. 1994b. Measurement of transcriptional activity in pathogenic bacteria recovered directly from infected host tissue. *Biotechniques*, 16(4): 641-4.
- Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockatell, D. E. Johnson, M. S. Donnenberg, R. A. Welch et H. L. Mobley. 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun*, 72(11): 6373-81.
- Snyder, J. A., B. J. Haugen, C. V. Lockatell, N. Maroncle, E. C. Hagan, D. E. Johnson, R. A. Welch et H. L. Mobley. 2005. Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 73(11): 7588-96.

- Sorsa, L. J., S. Dufke, J. Heesemann et S. Schubert. 2003. Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infect Immun*, 71(6): 3285-93.
- **Southern, E. M.** 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol*, **98**(3): 503-17.
- Stephani, K., D. Weichart et R. Hengge. 2003. Dynamic control of Dps protein levels by ClpXP and ClpAP proteases in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 49(6): 1605-14.
- Stock, J. B., A. J. Ninfa et A. M. Stock. 1989. Protein phosphorylation and regulation of adaptive responses in bacteria. *Microbiol Rev.*, 53(4): 450-90.
- Streit, W. R. et P. Entcheva. 2003. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Appl Microbiol Biotechnol*, 61(1): 21-31.
- Stromberg, N., B. I. Marklund, B. Lund, D. Ilver, A. Hamers, W. Gaastra, K. A. Karlsson et S. Normark. 1990. Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal alpha 1-4Gal-containing isoreceptors. *Embo J*, 9(6): 2001-10.
- Stromberg, N., P. G. Nyholm, I. Pascher et S. Normark. 1991. Saccharide orientation at the cell surface affects glycolipid receptor function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88(20): 9340-4.
- Takase, H., H. Nitanai, K. Hoshino et T. Otani. 2000. Requirement of the *Pseudomonas aeruginosa tonB* gene for high-affinity iron acquisition and infection. *Infect Immun*, 68(8): 4498-504.
- Talaat, A. M., S. T. Howard, W. t. Hale, R. Lyons, H. Garner et S. A. Johnston. 2002. Genomic DNA standards for gene expression profiling in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nucleic Acids Res*, 30(20): e104.
- Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor et T. E. Besser. 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun*, 68(3): 1400-7.
- Thelwell, N., S. Millington, A. Solinas, J. Booth et T. Brown. 2000. Mode of action and application of Scorpion primers to mutation detection. *Nucleic Acids Res*, 28(19): 3752-61.

- Theze, J., D. Margarita, G. N. Cohen, F. Borne et J. C. Patte. 1974. Mapping of the structural genes of the three aspartokinases and of the two homoserine dehydrogenases of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol*, 117(1): 133-43.
- **Thoden, J. B., X. Huang, F. M. Raushel et H. M. Holden**. 2002. Carbamoyl-phosphate synthesase. Creation of an escape route for ammonia. *J Biol Chem*, 277(42): 39722-7.
- Thony-Meyer, L., F. Fischer, P. Kunzler, D. Ritz et H. Hennecke. 1995. Escherichia coli genes required for cytochrome c maturation. J Bacteriol, 177(15): 4321-6.
- Togashi, A., T. Katagiri, S. Ashida, T. Fujioka, O. Maruyama, Y. Wakumoto, Y. Sakamoto, M. Fujime, Y. Kawachi, T. Shuin et Y. Nakamura. 2005. Hypoxia-inducible protein 2 (HIG2), a novel diagnostic marker for renal cell carcinoma and potential target for molecular therapy. *Cancer Res*, 65(11): 4817-26.
- Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch et S. M. Payne. 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun*, 69(10): 6179-85.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron et I. Stojiljkovic. 1996. Contribution of TonBand Feo-mediated iron uptake to growth of Salmonella typhimurium in the mouse. *Infect Immun*, 64(11): 4549-56.
- Valdebenito, M., B. Bister, R. Reissbrodt, K. Hantke et G. Winkelmann. 2005. The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherichia coli* strains by a novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method. *Int J Med Microbiol*, 295(2): 99-107.
- Valdivia, R. H. et S. Falkow. 1996. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonella typhimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Mol Microbiol*, 22(2): 367-78.
- Valdivia, R. H., A. E. Hromockyj, D. Monack, L. Ramakrishnan et S. Falkow. 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene*, 173(1 Spec No): 47-52.
- Valdivia, R. H. et S. Falkow. 1997. Probing bacterial gene expression within host cells. Trends Microbiol, 5(9): 360-3.
- van der Ven, K., M. De Wit, D. Keil, L. Moens, K. Van Leemput, B. Naudts et W. De Coen. 2005. Development and application of a brain-specific cDNA microarray for effect evaluation of neuro-active pharmaceuticals in zebrafish (*Danio rerio*). Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, 141(4): 408-17.

- Vassinova, N. et D. Kozyrev. 2000. A method for direct cloning of *fur*-regulated genes: identification of seven new *fur*-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 146 Pt 12: 3171-82.
- von Baum, H. et R. Marre. 2005. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications. *Int J Med Microbiol*, 295: 503-511.
- Warren, J. W. 1996. Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infection. In: H. L. T. Mobley et J. W. Warren, eds. <u>Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management</u>. Washington, D. C. ASM Press: 3-27.
- Watson, A., A. Mazumder, M. Stewart et S. Balasubramanian. 1998. Technology for microarray analysis of gene expression. *Curr Opin Biotechnol*, 9(6): 609-14.
- Weber, H., T. Polen, J. Heuveling, V. F. Wendisch et R. Hengge. 2005. Genome-wide analysis of the general stress response network in *Escherichia coli*: sigmaS-dependent genes, promoters, and sigma factor selectivity. *J Bacteriol*, 187(5): 1591-603.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg et F. R. Blattner. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(26): 17020-4.
- Westerlund-Wikstrom, B. et T. K. Korhonen. 2005. Molecular structure of adhesin domains in *Escherichia coli* fimbriae. *Int J Med Microbiol*, **295**(6-7): 479-86.
- White, S. W., J. Zheng, Y. M. Zhang et Rock. 2005. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu Rev Biochem*, 74: 791-831.
- Whitfield, C. et I. S. Roberts. 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 31(5): 1307-19.
- Williams, P. H., W. Rabsch, U. Methner, W. Voigt, H. Tschape et R. Reissbrodt. 2005. Catecholate receptor proteins in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development. *Vaccine*.
- Wullt, B., G. Bergsten, H. Connell, P. Rollano, N. Gebretsadik, R. Hull et C. Svanborg. 2000. P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. *Mol Microbiol*, 38(3): 456-64.
- Wullt, B. 2003. The role of P fimbriae for *Escherichia coli* establishment and mucosal inflammation in the human urinary tract. *Int J Antimicrob Agents*, 21(6): 605-21.

- Yamamoto, S., T. Tsukamoto, A. Terai, H. Kurazono, Y. Takeda et O. Yoshida. 1995. Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. *Microbiol Immunol*, 39(6): 401-4.
- Ye, R. W., T. Wang, L. Bedzyk et K. M. Croker. 2001. Applications of DNA microarrays in microbial systems. *J Microbiol Methods*, 47(3): 257-72.
- Yim, H. H., R. L. Brems et M. Villarejo. 1994. Molecular characterization of the promoter of osmY, an rpoS-dependent gene. J Bacteriol, 176(1): 100-7.
- Zhang, D., G. Zhang, M. S. Hayden, M. B. Greenblatt, C. Bussey, R. A. Flavell et S. Ghosh. 2004. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science*, 303(5663): 1522-6.
- Zhang, L., B. Foxman et C. Marrs. 2002. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol*, 40(11): 3951-5.

Sites internet

Site internet #1: Amersham biosciences:

www5.amershambiosciences.com/aptrix/upp01077.nsf/Content/literature_intro

Site internet #2: Conseil canadien de protection des animaux (CCPA):

www.ccac.ca/fr/CCAC Programs/ETCC/modul06F

Site internet #3 : Médecine et santé :

www.medecine-et-sante.com/anatomie/genitourinaire.html

Site internet #4: Mental Health:

www.mentalhealth.com/drug/p30-d05.html

Site internet #5: Grand dictionnaire terminologique (Office de la langue française) :

www.granddictionnaire.com