

Institut National de la Recherche Scientifique

**Étude des mutations de résistance des *Escherichia coli* uropathogènes
résistants à l'antibiotique fosfomycine**

Par

Kathleen Charles

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Jonathan Perreault, INRS-IAF

Examineur externe

Marie Archambault
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Directeur de recherche

Charles M. Dozois, INRS-IAF

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je remercie grandement mon directeur de recherche Charles Dozois pour m'avoir donné l'opportunité de travailler dans son laboratoire. Sans sa confiance rien n'aurait été possible. Grâce à lui, j'y ai côtoyé une équipe dynamique et performante, avec laquelle j'ai acquis de grandes connaissances théoriques et pratiques. J'y ai passé deux ans inoubliables, tant sur le plan humain qu'académique.

Je remercie tout particulièrement Sébastien Houle, l'agent de recherche, pour son aide technique, ses conseils et sa patience impressionnante quasi illimitée. Il est toujours disponible quand un membre du laboratoire en a besoin. C'est « Super Sébastien » à la rescousse!

Merci à Amélie Garénaux et Romain Coeurt, mes collègues de laboratoire, pour leurs conseils et leur soutien. Sans eux, ces deux années auraient été bien fades.

Sur le plan personnel, je remercie ma famille tout particulièrement ma Mère. Merci pour ses longues heures passées au téléphone, afin de m'envoyer des bouts de soleil pendant les durs moments. Merci à mes grands-parents qui me soutiennent quoi que je fasse, et comme ils disent si bien, la recherche c'est la vie!

RÉSUMÉ

Les bactéries *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) causent plus de 80 % des infections du tractus urinaire communautaires (ITU) chez les femmes. Les ITU sont une des infections les plus fréquentes dans les pays industrialisés et représentent un problème économique et de santé publique majeure. À ce jour, seuls les antibiotiques sont utilisés de routine afin de traiter les ITU communautaires. La fosfomycine est un antibiotique fréquemment utilisé dans ce but en Europe, depuis plus de 20 ans. Cependant, seulement 1,5 % à 3 % des souches UPEC cliniques portent des mutations de résistance à la fosfomycine, alors qu'elles présentent un taux élevé de mutations spontanées *in vitro* (10^{-8}).

Dans cette étude, nous avons étudié les mutations survenant dans des gènes connus comme étant des facteurs de résistance à la fosfomycine. Nous voulons comprendre pourquoi il y a très peu de bactéries résistantes isolées en milieu clinique, alors qu'il y en a tant après culture *in vitro*. Ces mutations de résistance concernent les gènes des transporteurs de sucres phosphates GlpT et UhpT, porte d'entrée de la fosfomycine dans la cellule. Elles concernent aussi les gènes *ptsI* de la phosphotransférase du phosphoénolpyruvate et *cyaA* de l'adénylate cyclase. Ces derniers interviennent dans la régulation et la synthèse de l'AMPc, un activateur des transporteurs GlpT et UhpT. Nous avons utilisé les souches uropathogènes CFT073, 536, ECOR72 et la souche de laboratoire *E. coli* K-12, pour générer des mutants dirigés dans ces gènes cibles, nécessaires à l'étude.

Les délétions affectent directement ou indirectement des systèmes d'importations de sucres, alors l'utilisation des sources de carbone par les bactéries nous informe sur les possibles mutations survenues. Nous avons déterminé la fréquence de génération spontanée de mutants résistants à la fosfomycine chez les souches sauvages, et ce, sur différents milieux de culture riches et en urine humaine. L'utilisation de l'urine a permis de mimer une des composantes du tractus urinaire. Par la suite nous avons isolé plusieurs mutants spontanés et selon leur profil phénotypique, par comparaison avec ceux des mutants dirigés, nous avons pu sélectionner les gènes susceptibles d'avoir subi une mutation afin de les séquencer. Les souches sauvages CFT073 et ECOR72 ont été délétées des deux gènes transporteurs de la fosfomycine ($\Delta uhpT$ et

$\Delta glpt$). Nous avons comparé leur capacité d'infection à celle des souches sauvages dans un modèle murin de co-infection ascendante.

Les résultats de co-infection ont montré que les gènes des transporteurs testés n'altèrent pas la capacité d'infection des souches utilisées. Les résultats obtenus en urine démontrent l'impact négatif de ce milieu sur la génération spontanée de mutants résistants, le type de mutation pouvant survenir et le niveau de sensibilité des mutants en présence de fosfomycine.

SUMMARY

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains are responsible for more than 80% of community acquired urinary tract infections (UTIs) among women. UTIs are the most frequent infections in industrialized countries and represent a major economic and public health concern. Fosfomycin has been a frequently used antibiotic for treatment of UTIs in Europe for more than 20 years now. However, overall only 1.5 % to 3 % of UPEC clinical isolates demonstrate resistance to fosfomycin, whereas the rate of spontaneous resistance to mutations *in vitro* is quite common (10^{-8}).

In this study, we studied the mutation of genes known to increase resistance to fosfomycin. We wanted to understand why there are so few resistant bacteria isolated from clinical cases (*in vivo*), when compared to the high rate of resistance *in vitro*. The resistance mutations include inactivation of the genes encoding sugar phosphate transporters (GltP and UhpT), which mediate entry of fosfomycin into the cell. In addition, inactivation of the *ptsI* gene encoding the phosphoenol pyruvate phosphotransferase enzyme I and the *cyaA* gene encoding adenylate cyclase, intervening in cyclic-AMP regulation and synthesis, also increases fosfomycin resistance as these genes positively regulate the GltP and UhpT transporters. We used UPEC strains CFT073, 536, ECOR72 and the *E. coli* K-12 laboratory strain in order to generate specific deletions of these target genes.

The wild-type CFT073 and ECOR72 strains and their isogenic mutants, deleted of the two fosfomycin transporters genes ($\Delta uhpT\Delta glpt$), were used to infect female mice in an ascending co-infection process. We also established a phenotypic profile corresponding to each of the targeted deletion mutants, by testing their growth in minimal media containing a variety of sole carbon sources and by determining the fosfomycin minimal inhibitory concentration (MIC). We determined

the rate of fosfomycin resistance *in vitro*, in rich medium and human urine. After that, we isolated several spontaneous mutants, and based on their phenotypic profile in comparison with those of genetically defined mutants, we were able to predict the type of spontaneous mutation and confirm certain changes by sequencing.

The results of co-infections in mice showed that loss of transporter genes did not modify the strain's ability to colonize the mouse urinary tract. Further, results following growth in urine showed the negative impact of this environment on the spontaneous generation of fosfomycin resistance, the types of mutations that occurred and the increased resistance of these mutants to fosfomycin.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : REVUE DE LITTÉRATURE	3
1.1 <i>ESCHERICHIA COLI</i>	4
1.2 LES DIFFÉRENTS PATHOTYPES D' <i>ESCHERICHIA COLI</i>	5
1.2.1 <i>E. coli</i> pathogènes intestinaux (InPEC)	5
1.2.2 <i>E. coli</i> pathogènes extraintestinaux (ExPEC)	9
1.3 CLASSIFICATION SEROLOGIQUE	9
1.4 ACQUISITION DES FACTEURS DE VIRULENCE DES <i>E. COLI</i>	10
1.4.1 <i>Les transferts horizontaux (HGT)</i>	10
1.4.2 <i>Mutations spontanées</i>	12
1.5 PRINCIPAUX FACTEURS DE VIRULENCE ASSOCIÉS AUX UPEC	13
1.5.1 <i>Les systèmes d'acquisition du fer</i>	14
1.5.2 <i>Les flagelles</i>	18
1.5.3 <i>Les toxines</i>	18
1.5.4 <i>Les fimbriae</i>	20
1.6 LES INFECTIONS DU TRACTUS URINAIRE COMMUNAUTAIRES (ITU)	22
1.6.1 <i>Généralités</i>	22
1.6.2 <i>Colonisation du tractus urinaire par les UPEC</i>	24
1.6.3 <i>Modèles d'infection et tests phénotypiques</i>	27
1.6.4 <i>Traitement des infections urinaires non compliquées</i>	28
1.7 LA FOSFOMYCINE (FO)	30
1.7.1 <i>Historique</i>	30
1.7.2 <i>Mode d'action de la fosfomycine</i>	31
1.7.3 <i>La fosfomycine comme traitement des infections du tractus urinaire non compliquées</i>	32
1.7.4 <i>Résistances à la fosfomycine chez les UPEC</i>	34
1.8 SYSTEMES IMPLIQUÉS DANS LA RÉSISTANCE À LA FOSFOMYCINE	36
1.8.1 <i>PtsI</i>	36
1.8.2 <i>GlpT</i>	39
1.8.3 <i>UhpT</i>	43
1.8.4 <i>CyaA</i>	47
1.8.5 <i>MurA</i>	48
HYPOTHESES ET OBJECTIFS	52

CHAPITRE 2 : MATERIELS ET METHODES.....	53
2.1 SOUCHES D'ESCHERICHIA COLI (E. COLI) UTILISEES.....	54
2.2 MILIEUX DE CROISSANCE ET MILIEUX SELECTIFS.....	57
2.3 TRANSFORMATION BACTERIENNE ET MANIPULATION DE L'ADN.....	58
2.4 PCR (REACTION DE POLYMERISATION EN CHAINE).....	59
2.5 MUTAGENESE.....	62
2.6 COMPLEMENTATION.....	63
2.7 COURBES DE CROISSANCE.....	65
2.8 AGGLUTINATION SUR LEVURE.....	66
2.9 COINFECTION DE TRACTUS URINAIRE DE SOURIS.....	66
<i>Préparation de l'inoculum.....</i>	<i>67</i>
<i>Infection des souris et dénombrement bactérien.....</i>	<i>67</i>
2.10 DETERMINATION DE LA CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) ET DU PROFIL PHENOTYPIQUE.....	68
2.11 DETERMINATION DE LA FREQUENCE DE GENERATION DE MUTANTS SPONTANES RESISTANTS A LA FOSFOMYCINE.....	69
2.12 SELECTION, SEQUENÇAGE ET ANALYSES DU GENOME DES MUTANTS SPONTANES RESISTANTS A LA FOSFOMYCINE.....	70
2.13 GRAPHIQUES ET TESTS STATISTIQUES.....	70
CHAPITRE 3 : RESULTATS.....	71
3.1 COURBE DE CROISSANCE.....	72
3.2 CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI).....	75
3.3 DETERMINATION DU PROFIL PHENOTYPIQUE.....	76
3.4 AGGLUTINATION SUR LEVURE.....	78
3.5 COINFECTION DE SOURIS.....	79
3.6 FREQUENCE SPONTANEE DE GENERATION DE MUTANTS RESISTANTS A LA FOSFOMYCINE.....	81
3.7 GENES POTENTIELLEMENT MUTES CHEZ LES MUTANTS SPONTANES RESISTANTS A LA FOSFOMYCINE.....	84
CHAPITRE 4 : DISCUSSION.....	88
4.1 COURBE DE CROISSANCE.....	89
4.2 CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE.....	91
4.3 TEST D'AGGLUTINATION SUR LEVURE.....	93
4.4 COINFECTION DE SOURIS.....	94
4.5 FREQUENCE DE MUTATION SPONTANEE.....	95
4.6 CARACTERISATION DES MUTANTS SPONTANES.....	97
4.6.1 <i>Détermination des gènes potentiellement mutés.....</i>	<i>97</i>
4.6.2 <i>Séquençage des gènes potentiellement mutés sélectionnés.....</i>	<i>98</i>

CONCLUSION 101
RÉFÉRENCES 103

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 2.1 : SOUCHES D' <i>E. COLI</i> UTILISÉES	55
TABLEAU 2.2 : LISTE DES AMORCES UTILISÉES	60
TABLEAU 2.3 : PLASMIDES UTILISÉS	65
TABLEAU 3.1 : CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE (CMI) DE FOSFOMYCINE (EN $\mu\text{G}/\text{ML}$)	75
TABLEAU 3.2: PROFIL PHÉNOTYPIQUE DES SOUCHES SAUVAGES MG1655, ECOR72, 536,.....	77
TABLEAU 3.3 : GÈNES POTENTIELLEMENT MUTÉS CHEZ LES MUTANTS SPONTANÉS DES SOUCHES ECOR72, CFT073, 536 ET MG1655, GÉNÉRÉS EN URINE ET MILIEUX RICHES	84
TABLEAU 3.4 : MUTATIONS DE RÉSISTANCE A LA FOSFOMYCINE IDENTIFIÉES CHEZ LES SOUCHES TESTÉES.....	86

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1.1 : SCHEMA D'UNE INFECTION PAR LES AIEC (<i>E. COLI</i> ADHÉRENT-INVASIF)	6
FIGURE 1.2 : SCHEMA D'INFECTION DES CELLULES ÉPITHÉLIALES INTESTINALES PAR LES DIFFÉRENTS PATHOTYPES D' <i>E. COLI</i>	8
FIGURE 1.3 : FACTEUR DE VIRULENCE PRÉSENT CHEZ LES SOUCHES UPEC	13
FIGURE 1.4 : STRUCTURE CHIMIQUE DES SIDÉROPHORES PRODUITS PAR LES <i>ESCHERICHIA COLI</i> PATHOGÈNES.....	17
FIGURE 1.5 : INFECTION ASCENDANTE DU TRACTUS URINAIRE PAR LES UPEC	25
FIGURE 1.6: CYCLE D'INFECTION DE LA VESSIE PAR LES UPEC FORMANT DES COLONIES BACTÉRIENNES INTRACELLULAIRES	26
FIGURE 1.7 : STRUCTURE DES DIFFÉRENTES FORMES DE LA FOSFOMYCINE.	31
FIGURE 1.8 : LIAISON ENTRE MUR A ET LA FOSFOMYCINE.....	32
FIGURE 1.9 : INTÉRACTION ENTRE LES DIFFÉRENTES PROTÉINES IMPLIQUÉES DANS LA RÉSISTANCE A LA FOSFOMYCINE	35
FIGURE 1.10 : SCHEMA DE L'OPÉRON PTS.....	37
FIGURE 1.11 : CASCADE DE PHOSPHORYLATION ENTRE LES DIFFÉRENTS COMPOSANTS DU SYSTÈME PTS EN PRÉSENCE DE GLUCOSE.....	38
FIGURE 1.12 : ENTRÉE DU GLYCÉROL-3-PHOSPHATE DANS LA CELLULE VIA SON TRANSPORTEUR GLPT	40
FIGURE 1.13 : RÉGULATION DE L'OPÉRON <i>GLPTQ</i>	41
FIGURE 1.14 : STRUCTURE DU TRANSPORTEUR GLPT.....	42
FIGURE 1.15 : MODE DE TRANSLOCATION « INTERRUPTEUR A BASCULE » DU TRANSPORTEUR GLPT	43
FIGURE 1.16 : RÉGULATION DES GÈNES MENANT A L'EXPRESSION DU TRANSPORTEUR UHPT.....	45
FIGURE 1.17 : STRUCTURE DU TRANSPORTEUR UHPT	46
FIGURE 1.18 : MODE DE TRANSLOCATION « INTERRUPTEUR A BASCULE » DU TRANSPORTEUR UHPT.....	47
FIGURE 1.19 : 1 ^{ÈRE} ÉTAPE DE LA SYNTHÈSE DES PEPTIDOGLYCANS DE LA PAROI CELLULAIRE	49
FIGURE 1.20 : SCHEMA DE L'OPÉRON <i>IBAG</i> ET <i>MUR A</i>	49
FIGURE 1.21 : STRUCTURE CRISTALLISÉE DE LA PROTÉINE MUR A	51
FIGURE 3.1 : COURBES DE CROISSANCE DES SOUCHES SAUVAGES MG1655, CFT073, 536 ET ECOR72 AINSI QUE DE LEURS DIFFÉRENTS MUTANTS DIRIGES, OBTENUES EN MILIEU RICHE LB.....	73
FIGURE 3.2 : COURBES DE CROISSANCE DES SOUCHES SAUVAGES MG1655, CFT073, 536 ET ECOR72 AINSI QUE DE LEURS DIFFÉRENTS MUTANTS DIRIGES, OBTENUES EN URINE DE FEMME	74
FIGURE 3.3 : AGGLUTINATION SUR LEVURE DES SOUCHES SAUVAGES MG1655 (A), ECOR72 (B), 536 (C), CFT073 (D) ET LEURS MUTANTS DIRIGES.	79
FIGURE 3.4: COLONISATION DE LA VESSIE ET DES REINS DE SOURIS CBA/J CO-INFECTÉES AVEC LES SOUCHES VIRULENTES CFT073 (<i>ΔLACZYA</i>) ET LE MUTANT DÉRIVÉ CFT073 (<i>ΔUHPTΔGLPT</i>)	80
FIGURE 3.5: NOMBRE D'UNITÉ FORMATRICE DE COLONIE PAR MILLILITRE DE MILIEU (UFC/ML), POUR LES SOUCHES	82

FIGURE 3.6 : FREQUENCE DE GENERATION DE MUTATIONS SPONTANEEES DES SOUCHES ECOR72, 536, CFT073 ET
MG165583

LISTE DES ABRÉVIATIONS

Aa	: acide aminé
ADN	: Acide désoxyribonucléique
A/E	: lésion d'effacement et d'attachement
APEC	: <i>Escherichia coli</i> pathogène aviaire
ARN	: acide ribonucléique
ATP	: Adénosine triphosphate
C	: Celcius
CBI	: colonie bactérienne intracellulaire
CLSI	: <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CMI	: Concentration minimale inhibitrice
Cm ^R	: Résistant au chloramphénicol
D.O.	: Densité optique
DAEC	: <i>Escherichia coli</i> à adhérence diffuse
DAP	: Acide diaminopimélique
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EAEC	: <i>Escherichia coli</i> enteroaggrégative
EHEC	: <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
EI	: Enzyme I
EII	: Enzyme II
EtBR	: Bromure d'éthidium
EUCAST	: <i>European Comittee on Antimicrobial Susceptibility testing</i>
ExPEC	: <i>Escherichia coli</i> pathogène extra intestinal
FDA	: <i>Food and Drug Administration</i>
Fe ³⁺	: Fer ferrique
FM	: Fréquence de mutation spontanée

FO	: Fosfomycine
FO ^R	: Résistant à la fosfomycine
G3P	: Glycerol-3-phosphate
G6P	: Glucose-6-phosphate
GmR	: Résistant à la gentamicine
HGT	: Transfert de gène horizontal
IPA	: îlots de pathogénicité
ITU	: Infection du tractus urinaire
KmR	: Résistant à la kanamycine
LPS	: lipopolysaccharides
MFS	: <i>Major Facilitator Superfamily</i>
MurA	: enzyme UDP-N-acétylglucosamine énoypyruvyl transférase
OFA	: Antitransporteur phosphate/Organophosphate
Pi	: Phosphate inorganique
Ptsi	: Phosphoénole pyruvate transférase
SPATE	: Autotransporteur sérine protéase
UDP	: uridine diphosphate
UPEC	: <i>Escherichia coli</i> uropathogènes

LISTE DES UNITÉS DE MESURE

°	: degré
µg	: microgramme
µl	: microlitre
CFU	: colonie formant unité
g	: gramme
kDa	: kilo dalton
kV	: kilovolt
L	: litre
mF	: millifarad
mg	: milligramme
ml	: millilitre
mM	: millimolaire
nm	: nanomètre
µm	: micromètre

Introduction

Les bactéries *Escherichia coli* (*E. coli*) sont responsables d'infection tant chez l'humain que chez les animaux. Elles se trouvent naturellement dans l'intestin des mammifères et oiseaux en tant que commensaux et sont inoffensives. Cependant, il arrive qu'elles colonisent accidentellement des niches écologiques, en dehors de l'intestin (méninges, vessie, etc.). Là, elles peuvent causer des maladies, grâce à des facteurs de virulence spécifiques et diversifiés (Kaper *et al.*, 2004).

Les bactéries *E. coli* uropathogènes (UPEC) ont la capacité de survivre dans les différents microenvironnements du tractus urinaire et causent des infections du tractus urinaire (ITU) (Palaniappan *et al.*, 2006). Plus de 80 % des ITU communautaires sont causées par les UPEC (Russo *et al.*, 2003). Ces infections touchent particulièrement les femmes. En effet 50 % d'entre elles auront une ITU au cours de leur vie (Lobel *et al.*, 2007). Cela représente un fardeau économique et de santé publique majeure. 1,6 milliard de dollars sont dépensés par année dans le traitement des ITU aux États-Unis. À ce jour, seuls les antibiotiques sont disponibles comme traitement. Néanmoins, on observe parmi les UPEC une augmentation de la prévalence des résistances aux antibiotiques utilisés de routine. De plus, l'étendage de clones multirésistants aux antibiotiques rend ces infections de plus en plus difficiles à contrôler. Cette problématique oblige les praticiens à adapter leurs méthodes empiriques de traitement. Ils doivent prendre en compte l'émergence des résistances locales lors de leur prescription (Gupta *et al.*, 2011, Thirion *et al.*, 2003).

La fosfomycine est un antibiotique bactériolytique bloquant la synthèse de la paroi cellulaire. Il affecte aussi bien les bactéries Gram positives que les bactéries Gram négatives. Il se fixe sur l'enzyme MurA nécessaire à la première étape de la biosynthèse des peptidoglycanes de la paroi. Cet antibiotique est fréquemment utilisé en Europe, depuis plus de 20 ans (Kahan *et al.*, 1974, Shrestha *et al.*, 2001). Néanmoins, seulement 1,5 % à 3 % des souches UPEC cliniques portent des mutations de résistance à la fosfomycine. Inversement, elles présentent un taux de mutations spontanées élevé *in vitro* (10^{-8}) (Nilsson *et al.*, 2003). Cette dualité entre les observations *in vivo* et *in vitro* a fait que cet antibiotique a longtemps été mis de côté en Amérique de Nord. Il n'est recommandé comme traitement empirique de premier plan que

depuis 2010 aux États-Unis Gupta *et al.*, 2011, Warren *et al.*, 1999 . Au Canada, il est commercialisé en pharmacie depuis 2012 (Pharma-Direct, 2012, Triton-Pharma-Inc., 2012). Ce regain récent d'intérêt pour cette molécule est notamment lié à la sensibilité à la fosfomycine de beaucoup de souches multirésistantes (Falagas *et al.*, 2010).

De ces constats découle naturellement une question : pourquoi y a-t-il si peu de mutants observés *in vivo* par rapport aux tests *in vitro*?

L'hypothèse émise à ce jour prévoit que les mutations responsables de la résistance à la fosfomycine rendent les bactéries moins aptes à survivre dans le tractus urinaire. Cette hypothèse est supportée par des études menées par Marchese *et al.*, 2003 et Nilsson *et al.*, 2003. Au cours de cette étude, nous avons tenté d'apporter une compréhension supplémentaire à cette dualité de résistance à la fosfomycine *in vivo* et *in vitro*.

Ainsi, nous avons étudié les mutations survenant dans les gènes connus comme étant responsables de la résistance à la fosfomycine. Les souches uropathogènes CFT073, 536, ECOR72 et la souche de laboratoire non-pathogène K-12 ont été utilisées pour générer des mutants dirigés dans ces gènes cibles. Ces mutations touchent les gènes des transporteurs de sucres phosphates GlpT et UhpT, par lesquels la fosfomycine entre dans la cellule. Elles concernent aussi les gènes *ptsI* codant pour une phosphotransférase du phosphoenolpyruvate et *cyaA* codant pour l'adénylate cyclase qui sont importants pour l'expression de ces transporteurs. Nos résultats obtenus en urine et en milieux riches nous ont permis de démontrer l'effet négatif de ce milieu sur la génération spontanée de mutants résistant à la fosfomycine, la concentration minimale inhibitrice des souches testées et le type de mutations pouvant survenir.

Dans le premier chapitre, nous présentons les aspects théoriques généraux permettant la compréhension du sujet d'étude, comme les caractéristiques des UPEC, les ITU, la fosfomycine et les mutations de résistance à cet antibiotique. Dans les chapitres suivants, nous traitons du protocole expérimental utilisé, puis des résultats obtenus. En dernier lieu, nous présentons l'analyse des résultats qui permet de mettre en évidence les nouvelles connaissances apportées sur ce sujet.

Chapitre 1 : Revue de littérature

1.1 *Escherichia coli*

La bactérie *E. coli* fut isolée pour la première fois de la flore intestinale de nourrissons, par le pédiatre et microbiologiste allemand Theodor Escherich en 1885. Le nom de ce micro-organisme a été donné en l'honneur de ce dernier. Depuis, elle est devenue l'une des bactéries les plus étudiées et les mieux caractérisées par les laboratoires de bactériologie (Berg, 2004). *E. coli* est un bacille Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae*. Sa taille varie en fonction des conditions de croissance. Elle se trouve en tant que commensal dans la flore intestinale d'animaux à sang chaud, y compris les humains. Elle est donc généralement inoffensive pour son hôte et lui est bénéfique. Elles permettent notamment de lutter contre la colonisation du tractus intestinal par des bactéries pathogènes. Cependant, certains types d'*E. coli* peuvent aussi être pathogènes. Ils peuvent infecter le site commensal et causer des maladies gastro-intestinales. D'autres peuvent accidentellement coloniser un site en dehors du tractus intestinal et y causer des maladies, par exemple des infections du tractus urinaire (ITU) auxquelles s'intéresse cette étude (voir section 1.6) (Berg, 2004, Kaper *et al.*, 2004)

Les bactéries *E. coli* possèdent la capacité de se transmettre des gènes entre elles. Elles peuvent également obtenir de nouveaux gènes via des plasmides ou des phages. Les souches d'*E. coli* pathogènes se distinguent des souches commensales, notamment par la grandeur de leur génome. Elles possèdent des portions d'ADN dits « îlots de pathogénités » (IPAs), qui leurs confèrent des facteurs de virulence. Associés aux symptômes causés et à l'interaction avec les cellules de l'hôte, ces facteurs permettent de les classer en différents pathotypes et de les identifier (Dozois *et al.*, 1999, Palaniappan *et al.*, 2006).

1.2 Les différents pathotypes d'*Escherichia coli*

À ce jour les différents pathotypes d'*E. coli* sont classés en sept groupes. Sept groupes concernent les pathogènes intestinaux (InPEC): les *E. coli* adhérent-invasives (AIEC) (Figure 1.1), *E. coli* entéropathogènes (EPEC), *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), *E. coli* entéroinvasives (EIEC), *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC), *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC) - (Figure 1.2). Le dernier groupe comprend les *E. coli* pathogènes extra-intestinaux (ExPEC). Les pathotypes EIEC et EAEC sont décrits comme présents uniquement chez l'humain, tandis que les autres infectent aussi les animaux (Kaper *et al.*, 2004, Palaniappan *et al.*, 2006).

1.2.1 *E. coli* pathogènes intestinaux (InPEC)

E. coli adhérent-invasifs (AIEC)

Les AIEC sont majoritairement connues pour être associées à la maladie de Crohn, qui provoque de graves inflammations de l'intestin. Elles sont retrouvées principalement dans le petit intestin des patients atteints de la maladie de Crohn. Ces bactéries adhèrent aux cellules épithéliales des Plaques de Peyers de l'intestin. Elles reconnaissent le récepteur CEACAM6 (*Carcinoembryonic Antigen-Related Cell Adhesion Molecule 6*) particulièrement surexprimé durant l'inflammation. Ces dernières provoquent des ulcères, par lesquels pénètrent les bactéries dans les cellules épithéliales (Strober, 2011) - Figure 1.1 :

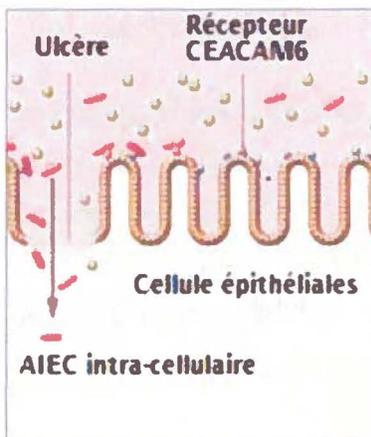


Figure 1.1 : Schéma d'une infection par les AIEC (*E. coli* adhérent-invasif)

Les AIEC (bâtonnet rouge) se fixent sur les récepteurs CEACAM6 des cellules épithéliales (points bleus). Les ulcères, dus à l'inflammation, permettent l'entrée des AIEC et des bactéries de la flore intestinale (points verts) dans les cellules épithéliales (Modifié de Strober, 2011).

***E. coli* entéropathogènes (EPEC)**

Les EPEC sont le premier pathotype décrit. Elles causent des diarrhées persistantes, de la fièvre et des vomissements, chez l'enfant et les animaux. Elles ont la caractéristique de s'attacher aux cellules épithéliales intestinales en provoquant un réarrangement de leur cytosquelette. Cela est marqué par la présence de lésions dites d'attachement et d'effacement (A/E) engendrées par l'effacement des microvillosités de l'intestin et la formation d'une structure en forme de piédestal en dessous de la zone d'attachement (Kaper *et al.*, 2004).

***E. coli* entérohémorragiques (EHEC)**

Les EHEC occasionnent également des lésions A/E. Elles sont la cause d'infection accidentelle chez l'humain principalement via l'ingestion d'aliments ou d'eaux contaminées par les bactéries. Leur réservoir est essentiellement animal, elles sont des pathogènes zoonotiques, le plus souvent isolées d'animaux domestiques, porteurs asymptomatiques. Elles ont la caractéristique de produire des toxines de types shiga et causent des diarrhées parfois sanguinolentes avec ulcération de l'intestin. Cela peut dégénérer au syndrome d'urémie hémolytique. Les souches les plus connues et étudiées sont des EHEC de sérotypes O157:H7 (Donnenberg, 2013).

E. coli entérotoxigènes (ETEC)

Les ETEC causent surtout des diarrhées chez les enfants dans les pays en voie de développement, chez les animaux d'élevage et les diarrhées dites « du voyageur ». Elles sont pathogènes principalement à cause des toxines thermolabiles ou thermostables que produisent ces souches (Dozois *et al.*, 1999, Kaper *et al.*, 2004)

E. coli entéroinvasives (EIEC)

Les EIEC causent des diarrhées qui peuvent dégénérer en dysenterie. Comme leur nom l'indique, elles ont la capacité d'envahir les cellules épithéliales de leur hôte et de s'y répliquer, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire. Elles sont génétiquement proches des espèces *Shigella* spp plus souvent responsables des dysenteries (Dozois *et al.*, 1999, Kaper *et al.*, 2004) .

E. coli à adhérence diffuse (DAEC) et E. coli entéroaggrégatives (EAEC)

Les DAEC et EAEC causent des diarrhées chez l'humain dans les pays développés et en voie de développement et se caractérisent par les différents types d'adhérence aux cellules Hep-2 en culture. Grâce à la présence de plasmide porteur de gènes codant pour des fimbriae particuliers (AAF), les EAEC ont la capacité de s'autoaggréger entre elles, en formant un amas lors de l'attachement aux cellules, semblable à un amoncellement de briques. Elles provoquent également l'augmentation de la sécrétion de mucus par les cellules épithéliales et peuvent former des biofilms à la surface des cellules. Elles sécrètent des toxines, mais pas de type shiga (Ericsson *et al.*, 2007, Kaper *et al.*, 2004).

Les DAEC s'attachent aux cellules Hep-2 de façon diffuse, comme leur nom l'indique, grâce à la présence des fimbriae F1845 de la famille des adhésines « Dr ». Les DAEC induisent un effet cytoplasmique sur les cellules de l'épithélium intestinal lors de leur adhésion. Cela provoque des extensions cellulaires qui enveloppent les bactéries adhérees. La présence de ces adhésines permet l'attachement caractéristique des DAEC (Berger *et al.*, 2004, Kaper *et al.*, 2004).

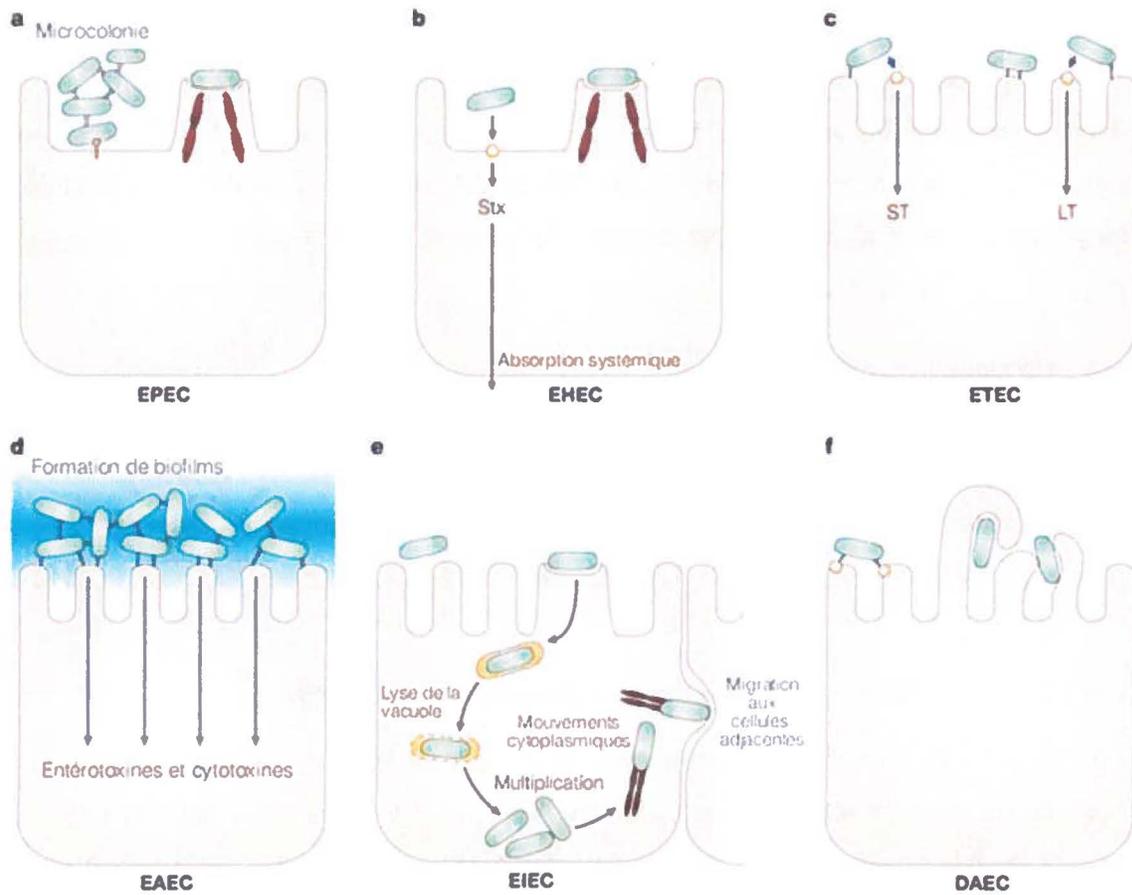


Figure 1.2 : Schéma d'infection des cellules épithéliales intestinales par les différents pathotypes d'*E. coli* pathogènes intestinaux

a) Les EPEC forment des lésions d'attachement et effacement, une structure en forme de piédestal, et détruisent les microvillosités **b)** Les EHEC produisent des toxines de type shiga (Stx), en plus d'un piédestal, la destruction des microvillosités et des lésions d'attachement et d'effacement **c)** Les ETEC produisent deux types de toxines (thermosensible (ST) et thermolabile (LT)). **d)** Les EAEC forment des biofilms et sécrètent des entérotoxines et cytotoxines. **e)** Les EIEC envahissent la cellule hôte et peuvent s'y multiplier. **f)** Les DAEC induisent la production d'une excroissance cellulaire qui les enveloppe (modifié de Kaper *et al.*, 2004).

1.2.2 *E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC)

Les ExPEC regroupent des souches pathogènes pour les humains et les animaux.

Les pathogènes animaux sont la cause de problèmes économiques notamment dans le secteur agricole. Les souches *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) causent d'énormes pertes chez la volaille, certaines souches (REPEC) provoquent des diarrhées chez les lapins. Elles amènent beaucoup de perte aussi chez les porcs et les bovidés d'élevage. L'infection la plus fréquente est la colibacillose et la septicémie qui peut en découler. (Bélangier *et al.*, 2011, Dozois *et al.*, 1999, Institut-de-l'élevage, 2008).

Les ExPEC pathogènes humains proviennent le plus souvent de la flore commensale intestinale. Il arrive qu'elles colonisent accidentellement un site autre que le tractus gastro-intestinal où sont activés des facteurs de virulence leur permettant d'infecter. Elles causent aussi occasionnellement des maladies chez les individus aux défenses immunitaires affaiblies (Donnenberg, 2013).

Ce pathotype regroupe diverses souches d'*E. coli* responsables de différents types d'infections (intra-abdominale, pneumonie, abcès, etc.). Les ExPEC sont impliquées dans la majorité des infections à *E. coli* dans les pays industrialisés. Les deux groupes les plus notables sont les *E. coli* associés aux méningites néonatales (MNEC) et les *E. coli* uropathogènes (UPEC). Les MNEC sont responsables de la majorité des méningites néonatales dues à des bactéries à Gram négatif. Elles sont mortelles dans 15 % à 40 % même dans les pays industrialisés. Les UPEC, auxquelles nous nous intéressons dans cette étude, sont responsables des infections du tractus urinaire (ITU), une des plus communes et des plus fréquentes infections causées par les ExPEC (Donnenberg, 2013).

1.3 Classification sérologique

Le sérotypage permet de distinguer les différents types d'*E. coli*. Cette classification est basée sur l'identification d'antigène O de la paroi, H des flagelles ou K de la capsule.

Les antigènes O composent la chaîne latérale des lipopolysaccharides (LPS) de la paroi bactérienne. Les antigènes H sont des protéines contenues dans les flagelles tandis que les antigènes K sont des polysaccharides de la capsule. La classification sérologique joue un rôle

important dans l'étude des *E. coli*. Le serotypage O : K : H est encore un standard pour les études épidémiologiques (Torres, 2010, Zourob *et al.*, 2008).

Les fimbriae sont essentiels pour la colonisation du tractus intestinal et par conséquent pour la pathogénicité des souches *E. coli* uropathogènes. La classification standard de ces souches peut être complétée par la distinction des antigènes des fimbriae, nommés F (Czirok *et al.*, 1982, Orskov *et al.*, 1981).

1.4 Acquisition des facteurs de virulence des *E. coli*

La diversité de la capacité pathogénique de l'espèce *E. coli* vient de l'acquisition de facteurs de virulence et de la plasticité de l'espèce. Pour comprendre cette diversification, il faut comprendre les mécanismes permettant cette évolution. Les mécanismes génétiques majeurs impliqués sont : les transferts de gènes horizontaux - concernant l'acquisition de nouveaux gènes - et les mutations spontanées - concernant la modification de gènes déjà existants (Donnenberg, 2013, Ronald, 2008).

La persistance d'une modification dans un gène présent ou de l'introduction d'un nouveau gène dépend de son utilité pour la bactérie. Aussi, en plus des gènes de virulence, il peut aussi être transféré des gènes métaboliques, ce qui leur permet par exemple d'utiliser de nouvelles sources de carbone. Ces mutations sont dites pathoadaptatives, car elles confèrent un avantage sélectif à la souche, le plus souvent dans sa virulence ou la capacité à résister à des facteurs létaux comme les antibiotiques. Cela confère aux bactéries la capacité de coloniser de nouvelles niches écologiques, de survivre dans un milieu changeant, et de compétitionner avec d'autres espèces bactériennes. Ils apportent un avantage évolutif à l'espèce (Francino, 2012, Ronald, 2008).

1.4.1 Les transferts horizontaux (HGT)

Les transferts de gènes horizontaux consistent au transfert de gènes d'une souche à une autre. Ce qui se différencie du transfert de gène vertical, qui consiste au transfert de matériel génétique de la cellule mère à la cellule fille (Donnenberg, 2013). Malgré l'acquisition de nouveaux gènes, la taille des génomes des *E. coli* reste relativement conservée, car l'acquisition de ces nouveaux gènes est limitée. En effet, théoriquement, plus la taille du chromosome bactérien est grande plus

la vitesse de multiplication des bactéries est lente, notamment dû à la vitesse cinétique des ribosomes. Aussi, le pourcentage en base G (guanine) et C (cytosine) de l'ADN bactérien est caractéristique de chaque espèce. Certaines portions de l'ADN qui ont été « ajoutées » possèdent un pourcentage différent de celui correspondant à son hôte. Elles constituent ce que l'on appelle des marqueurs de transfert horizontal (Bergthorsson *et al.*, 1998, Lawrence *et al.*, 1997).

Les éléments mobiles tels les bactériophages, les plasmides et les transposons contribuent majoritairement aux mécanismes de transferts horizontaux de gènes.

Les bactériophages sont des virus de bactéries et l'entité biologique la plus abondante sur la planète avec 10^{31} bactériophages (Schaechter, 2009). Ce sont donc des vecteurs importants de transferts de gènes entre bactéries. Ils ont besoin d'introduire leur ADN dans leur hôte et d'utiliser sa machinerie protéique pour se reproduire. Lors de leur multiplication, ils incluent des portions du chromosome bactérien dans le leur. Ils transportent ainsi des segments d'ADN pouvant contenir des gènes de virulence ou métaboliques d'une bactérie à une autre (Lawrence *et al.*, 1998)

Les plasmides sont des molécules d'ADN circulaires extra-chromosomiques pouvant co-habiter dans la cellule avec le chromosome bactérien. Certains plasmides sont transportés d'une bactérie à une autre via la conjugaison bactérienne. Ceci implique le transfert d'ADN plasmidique à partir d'une cellule donneuse vers une cellule receveuse par un complexe multi-protéique qui s'étend sur leur paroi cellulaire bactérienne. De nombreuses souches d'*E. coli* et de *Shigella* possèdent des plasmides qui présentent, un ou plusieurs facteurs de virulence et résistance aux antibiotiques (Donnenberg, 2013, Porter *et al.*, 2012).

Les plasmides et les bactériophages peuvent être des porteurs d'îlots de pathogénicités abordés précédemment. Certains éléments de virulence comme les A/E des EPEC et EHEC se trouvent sur des IPAs et sont donc des éléments transférables d'une souche à une autre (Dozois *et al.*, 1999, Hacker *et al.*, 2000).

Les transposons, ou séquences d'insertions (IS), sont des éléments mobiles qui peuvent se déplacer et se multiplier de façon autonome grâce au mécanisme de transposition (Peter *et al.*, 2001). La translocation peut causer des mutations telles des insertions ou des fusions de réplicons etc. Seules les IS peuvent être transférées lors de la translocation, cependant une portion d'ADN entourée de deux IS peut être transloquée dans le même processus. C'est ce que

l'on appelle un transposon composé. Ils permettent donc de transporter des gènes de virulence, de résistance aux antibiotiques ou métaboliques d'une souche à une autre (Crépin *et al.*, 2012a, Mahillon *et al.*, 1999).

1.4.2 Mutations spontanées

Ces mutations concernent la modification de gènes déjà existants. Elles peuvent être des mutations ponctuelles, des insertions ou des délétions, qui amènent à des changements dans la fonction de ces gènes ou l'inactivation de ces derniers. Ce sont des mutations qui surviennent face à une pression de sélection de l'environnement. Il en résulte la propagation des clones avantageés par ces modifications. Du fait qu'*E. coli* est largement répandu, tant dans l'environnement que dans une grande variété d'hôtes différents, il est un micro-organisme d'intérêt permettant d'étudier l'impact de l'environnement sur l'organisation et la fonction du génome bactérien. Chez *E. coli*, les mutations spontanées semblent apparaître à une fréquence élevée quand elles sont bénéfiques. Elles apparaissent majoritairement face à une pression positive de sélection (Cairns *et al.*, 1991, Chen *et al.*, 2006, Ronald, 2008).

La détection des mutations spontanées est difficile, car ces mutations sont plus subtiles que celles produites par des HGTs, ainsi leur étude représente un défi pour la recherche. Cependant dans le cas de mutations survenant dans des gènes aux fonctions connues, l'étude peut être basée sur la modification ou la perte de celles-ci. Par exemple, le fimbriae de type 1 est essentiel pour l'adhésion des bactéries *E. coli* aux cellules vésicales. L'étude des mutations spontanées dans le signal peptide du fimbriae de type 1 a pu se faire en observant la modification de la morphologie de ce fimbriae dans les bactéries, et ainsi que la modification de l'adhésion des bactéries aux cellules vésicales (Ronald, 2008).

1.5 Principaux facteurs de virulence associés aux UPEC

Les UPEC font partie des ExPEC. Les facteurs associés à leur virulence sont très nombreux et regroupent des fimbriae, des flagelles, des polysaccharides de surface (capsule et lipopolysaccharides), des systèmes d'acquisition du fer (sidérophores), des auto-transporteurs, des toxines (Jaureguy, 2009, Ronald, 2008) - (voir Figure 1.3). En raison de leur grand nombre, seulement les facteurs les plus communs associés aux UPEC seront présentés dans cette section : les sidérophores (salmochélines – entérobactine – yersiniabactine – aérobactine), les flagelles, les toxines telles hémolysine, Sat, Vat et le facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF1) puis les fimbriae de type 1, P et F1C (Kaper *et al.*, 2004, Ronald, 2008).

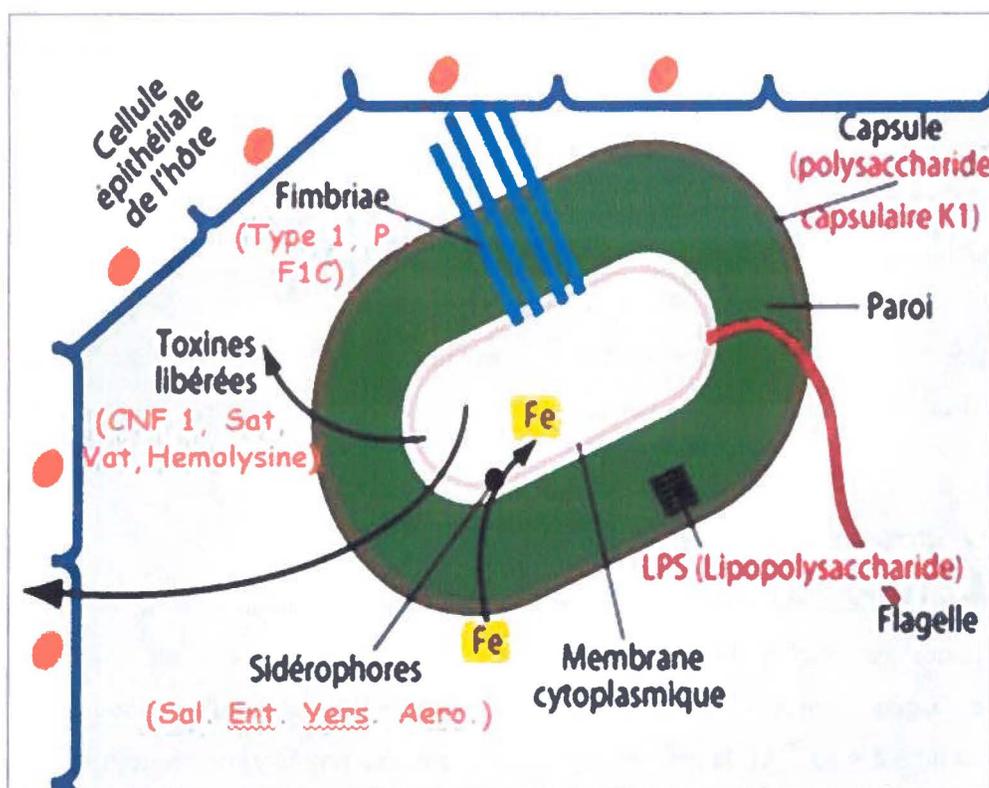


Figure 1.3 : Facteur de virulence présent chez les souches UPEC

Abréviations : CNF : facteur nécrosant cytotoxique ; Sal (salmochéline) ; Ent (entérobactine), Yers (Yersiniabactine), Aero (aérobactine) (Modifié de Jaureguy, 2009).

1.5.1 Les systèmes d'acquisition du fer

Le fer est un élément essentiel à la survie de la plupart des micro-organismes. Ce métal de transition est impliqué dans beaucoup de réactions métaboliques comme la biosynthèse de l'ADN ou la régulation génique. Comme barrière contre le développement des micro-organismes, l'hôte séquestre le fer afin de le rendre moins disponible. Les concentrations de fer chez les hôtes d'*E. coli* varient de l'ordre du 10^{-18} à 10^{-24} M, selon l'organe ou le système biologique impliqué. Cependant, *E. coli* a besoin d'un minimum de 10^{-6} M pour croître (Simon C Andrews *et al.*, 2003, Dho-Moulin *et al.*, 1999, Garénaux *et al.*, 2011, Wiles *et al.*, 2008). Les bactéries ont développé des petites molécules d'acquisition du fer nommées sidérophores (voir Figure 1.4). En raison de leur très forte affinité pour le Fe^{3+} , les sidérophores peuvent « extraire » le fer lié aux ferroprotéines de l'hôte (transferrine, lactoferrine, etc.). Cela permet aux bactéries de coloniser des niches biologiques où le fer est peu disponible, dont le tractus urinaire. (Simon C Andrews *et al.*, 2003, Faraldo-Gómez *et al.*, 2003, Wiles *et al.*, 2008). Ces systèmes de sidérophores sont régulés par la protéine Fur et dépendent de la concentration intracellulaire en fer. La protéine Fur se couple avec ce dernier quand la concentration intracellulaire de fer est suffisante. Une fois complexées, Fur se fixe sur les promoteurs des gènes cibles de la synthèse des sidérophores, et réprime leur expression. Le petit ARN RyhB, aussi régulé par Fur, dégrade les ARNm des protéines d'entreposage du fer. Cela permet le maintien d'une certaine homéostasie du fer (Garénaux *et al.*, 2011, Heesemann *et al.*, 1993).

1.5.1.1 L'entérobactine

L'entérobactine (l'entérochéline) fait partie de la famille des catécholates et est produite par presque toutes les souches d'*E. coli* (Voir Figure 1.4). Ce sidérophore est synthétisé par un groupe de six gènes : *entABCDEF* (Garénaux *et al.*, 2011). Il possède un fort pouvoir de fixation du fer avec un $K_d \approx 10^{-49}$ M, largement supérieur à celui des protéines de séquestration du fer de l'hôte. Ces dernières ont un $K_d \approx 10^{-20}$ M, (Crosa *et al.*, 2004, Wiles *et al.*, 2008). Afin de lutter contre les sidérophores il existe des défenses mises en place par l'hôte telle la lipocaline-2 (NGAL). Elle peut emprisonner l'entérobactine et limiter l'apport en fer aux bactéries en la rendant indisponible. Elle agit comme un agent bactériostatique (Goetz *et al.*, 2002). De ce fait, l'implication de l'entérobactine dans la virulence des UPEC est controversée. En effet, des

études chez la souche UPEC CFT073, déficiente dans la production de l'entérobactine, ont montré qu'elle peut malgré tout infecter la vessie et les reins lors d'une infection ascendante du tractus urinaire, dans un modèle murin (Torres *et al.*, 2001). Cela serait dû au fait du NGAL produit par l'hôte, qui séquestrerait l'entérobactine la rendant indisponible pour la bactérie. Il faut noter que chez *E. coli* la régulation, la structure et la fonction de l'entérobactine sont similaires chez les souches sauvages et les souches pathogènes (Crosa *et al.*, 2004).

1.5.1.2 Les salmochélines

Les salmochélines sont aussi des sidérophores de types catécholates. Il existe sept sous-types de la famille des salmochélines, dont le principal sidérophore est S4. Sa synthèse est liée à celle de l'entérobactine, car il est le produit de la glycosylation d'un groupement de l'entérobactine. Le NGAL peut séquestrer l'entérobactine, mais pas les salmochélines. Le corps de ce sidérophore est composé d'une molécule d'entérobactine à laquelle la protéine IroB rajoute un à trois glucoses (voir Figure 1.4). Elle ne peut être séquestrée par le NGAL à cause d'un trop grand encombrement stérique. Les salmochélines permettent aux bactéries de contourner les défenses de l'hôte (Wiles *et al.*, 2008) (Bister *et al.*, 2004, Hantke *et al.*, 2003, Wiles *et al.*, 2008). Les groupes de gènes codant pour ces sidérophores sont *iroN* et *iroBCDE*. Ils sont responsables de la synthèse, du transport et de la dégradation des salmochélines et sont importants pour la virulence (Dozois *et al.*, 2003, Garénaux *et al.*, 2011). Ce sidérophore peut être retrouvé sous des formes plus ou moins glycosylées : soit des entérobactines monoglycosylées (MGE), des entérobactines diglycosylées (DGE) ou des entérobactines triglycosylées (TGE). Ces trois formes sont appelées les salmochélines. Ces dernières semblent avoir une plus grande prévalence chez les UPEC (Bauer *et al.*, 2002, Lin *et al.*, 2005, Russo *et al.*, 1999).

1.5.1.3 L'aérobactine

L'aérobactine est un sidérophore de la famille des citrates hydroxamates (Voir Figure 1.4) (Garénaux *et al.*, 2011). Elle a été découverte initialement chez *Aerobacter aerogenes*. Un groupe de quatre gènes permet sa synthèse, *iucABCD*, et un gène *iutA* code pour son récepteur. Ils se situent sur un plasmide de virulence nommé ColV et peuvent être retrouvés sur le chromosome,

associés aux îlots de pathogénicités (J R Johnson, 1991, Waters *et al.*, 1991). Comparée à l'entérobactine, elle est plus stable et plus soluble. Dans le sérum, elle est plus efficace que l'entérobactine pour capter le fer. La présence de plusieurs sidérophores fait qu'en cas de mutation de l'aérobactine, les autres systèmes prennent le relais (Garénaux *et al.*, 2011, J R Johnson, 1991, Torres *et al.*, 2001). Il a été démontré que les souches UPEC produisant l'aérobactine ont la capacité de croître plus rapidement dans l'urine que celles ne la produisant pas (Montgomerie *et al.*, 1984).

1.5.1.4 La yersiniabactine

La yersiniabactine fait partie de la famille des catéchols. Comme son nom l'indique, la yersiniabactine fut pour la première fois isolée chez une souche virulente de *Yersinia enterocolitica* (voir Figure 1.4) - (Heesemann *et al.*, 1993). Les gènes codant pour la yersiniabactine se trouvent sur un IPA nommé HPI (*High pathogenicity island*), qui se trouvait à l'origine sur *Y. enterocolitica* (Achtman *et al.*, 1999). La yersinabactine a un rôle important dans l'évolution de la colonisation du tractus urinaire par les UPEC, car elle participe à la formation des biofilms (Hancock *et al.*, 2008).

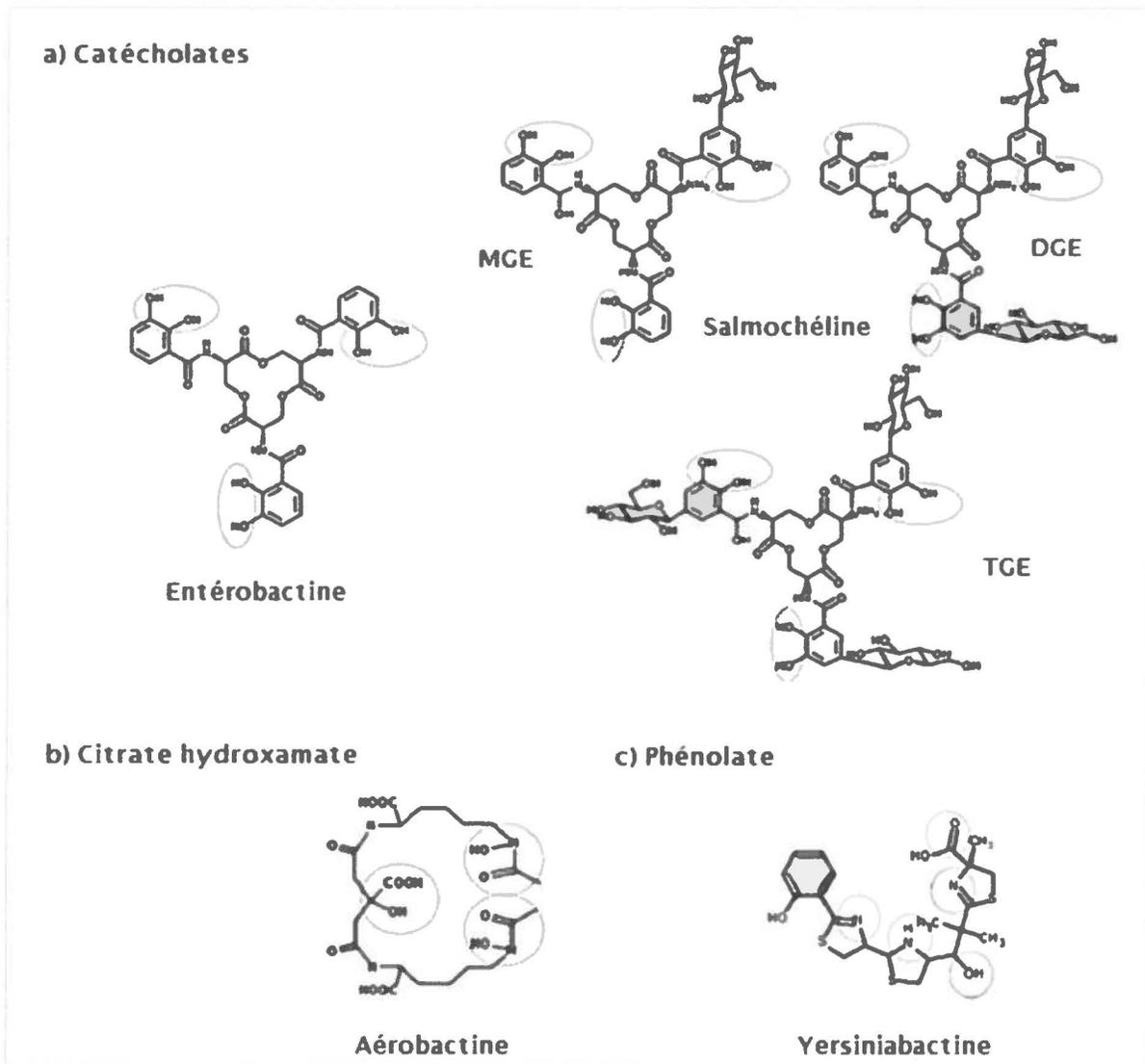


Figure 1.4 : Structure chimique des sidérophores produits par les *Escherichia coli* pathogènes

a) Sidérophores de type Catécholates : entérobactine et les trois formes de salmochéline (MGE, DGE, TGE) **b)** sidérophore de type citrate hydroxamate : aéro bactéine **c)** Siderophore de type phénolate : yersiniabactine. Les cercles représentent les régions de fixation du fer. (Modifiée de Garénaux *et al.* (2011)).

1.5.2 Les flagelles

Les flagelles servent à la motilité des bactéries. Ils mesurent 20 nm de largeur et ont une longueur qui varie de 2 à 3 fois la taille de la cellule. Ils se composent d'un corps basal, d'un crochet et d'un filament flagellaire composé de flagélline (antigène H). De cinq à dix flagelles peuvent être observés, répartis autour de la bactérie et plus de quarante gènes sont impliqués dans la production de ceux-ci (Macnab, 2003). Ils permettent aux bactéries de se déplacer d'un milieu à un autre. La direction empruntée par la bactérie est donnée par chimiotactisme. C'est-à-dire que les bactéries sont capables de détecter les variations de leur milieu, telles la quantité de nutriment ou la toxicité. Différents signaux sont émis via l'intermédiaire de protéines membranaires, incitant la production de flagelles. Ainsi la bactérie peut se diriger vers une source de nourriture ou encore fuir un environnement trop hostile (La Ragione *et al.*, 2002). Chez les UPEC, les flagelles ne sont pas essentiels à la colonisation du tractus urinaire. Cependant ils confèrent un sérieux avantage en leur permettant de migrer de l'urètre à la vessie puis vers les reins. Ils leur permettent de coloniser une plus grande partie du tractus urinaire (Lane *et al.*, 2005).

1.5.3 Les toxines

Les principales toxines produites par les UPEC sont l'hémolysine, Sat et Vat.

1.5.3.1 L'hémolysine

L'hémolysine est toxique pour un grand nombre de types cellulaires. Elle provoque la lyse des érythrocytes et donc une inflammation et un affaiblissement des défenses immunitaires. Il existe trois types d'hémolysines, et l' α -hémolysine est représentée chez plus de 50 % des UPEC (Beutin, 1991, J R Johnson, 1991). Elle est codée par l'opéron *hlyCABD*. L'hémolysine forme des pores dans la membrane plasmique des érythrocytes. Cela induit notamment la lyse des cellules et un relargage de nutriments dans le milieu, dont le fer, ce qui favorisera la croissance bactérienne. Le fer étant un régulateur de l'opéron *hlyCABD*, lorsque la concentration intracellulaire en fer augmente, les gènes sont réprimés (Macnab, 2003). L' α -hémolysine détruit les cellules de l'urothélium et crée une hémorragie. Cela permet à la bactérie d'atteindre le

système sanguin et de causer une septicémie. Chez les UPEC, elle est associée majoritairement aux pyélonéphrites (J R Johnson *et al.*, 2001).

1.5.3.2 Le facteur nécrosant cytotoxique 1

La libération du facteur nécrosant cytotoxique 1 (CNF1) induit une altération de la morphologie des cellules eucaryotes (Caprioli *et al.*, 1983, Davis *et al.*, 2006). Le CNF1 est retrouvé dans plus d'un tiers des UPEC et est associé aux UTI sévères. Il aide à la survie des bactéries en diminuant la faculté de phagocytose des leucocytes. Cela diminue la réponse inflammatoire de l'hôte (Davis *et al.*, 2006, Davis *et al.*, 2005, Lemonnier *et al.*, 2007). Il est codé par le gène *cnf1* qui se situe sur un IPA, tout de suite après l'opéron de l' α -hémolysine chez les UPEC. Un seul transcrit pour le CNF1 et l' α -hémolysine est produit (Falbo *et al.*, 1993, Lemonnier *et al.*, 2007). Pour résumer son mode d'action très complexe, on peut dire que le CNF1 entre dans le cytosol de la cellule cible et provoque une activation constitutive de la GTPase Rho. Il en découle la modification de plusieurs fonctions de la cellule, comme la perturbation du cytosquelette ou encore de l'expression d'immunomodulateurs (Doye *et al.*, 2002, Lemonnier *et al.*, 2007, Mobley *et al.*, 2009).

1.5.3.3 Les toxines Sat et Vat

Les toxines Sat et Vat font partie de la famille des auto-transporteurs et se retrouvent chez les souches UPEC. Les auto-transporteurs regroupent des protéines qui possèdent déjà toute la machinerie pour pouvoir être sécrétées à l'extérieur de la cellule bactérienne. Ils se retrouvent chez les bactéries à Gram négatif, ils ont la même structure, mais peuvent avoir des fonctions différentes : toxines (tel Sat ou Vat), invasives, facteurs de motilité, etc. Sat et Vat font partie de la sous-famille des autotransporteurs sérine protéase des *Enterobacteriaceae* dont l'acronyme est SPATE. (Guyer *et al.*, 2000, Henderson *et al.*, 1998, Henderson *et al.*, 2004)

La toxine Sat a été découverte chez la souche UPEC CFT073. Son gène se trouve sur un IPA. Elle possède une activité cytotoxique sur les cellules de l'urothélium et des reins (Guyer *et al.*, 2000). Sat produit des modifications et des anomalies de la structure cellulaire en attaquant le fonctionnement du cytosquelette. On peut observer la perte des jonctions cellulaires, la production de vacuoles ou encore des dommages au niveau des glomérules rénaux. Cependant,

les dommages infligés aux tissus permettraient aux bactéries d'atteindre le système sanguin, augmentant sa virulence (Guyer *et al.*, 2002, Maroncle *et al.*, 2006). La toxine sécrétée Vat, tout comme Sat, a aussi un effet cytotoxique sur les cellules de l'hôte. Elle produit la formation de vacuoles intracellulaires et son gène est aussi présent sur un IPA.

Les expériences *in vivo* n'ont pas encore permis de démontrer un rôle essentiel pour les toxines Sat et Vat pour la colonisation du tractus urinaire par les UPEC. Cependant, elles sont reconnues comme étant produites chez les UPEC lors d'ITU (Guyer *et al.*, 2002, Henderson *et al.*, 2004, Parreira *et al.*, 2003).

Étant donné la conservation remarquable de Sat et Vat parmi les souches UPEC, il est fort probable que leur rôle est important pour la virulence. Des investigations plus poussées doivent être entreprises pour découvrir leur fonction spécifique dans les ITU.

1.5.4 Les fimbriae

Les fimbriae (ou pili) servent à l'attachement des bactéries aux cellules de l'hôte. L'adhésion est une étape primordiale pour l'établissement des ITU. Un flux constant d'urine est présent dans la vessie, les bactéries doivent pouvoir y faire face afin de ne pas être expulsée. Elles doivent pouvoir « coller aux cellules » en dépit de la pression de l'environnement. Une fimbriae efficace dans un organe ne le sera pas forcément dans l'autre (Hacker *et al.*, 2000, Lobel *et al.*, 2007). Les fimbriae les plus importants pour la colonisation chez les UPEC sont les fimbriae de type 1, P et F1C (Kaper *et al.*, 2004, Ronald, 2008).

1.5.4.1 Les Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 ont la plus grande prévalence, ils sont retrouvés chez presque toutes les souches d'*E. coli* (Mulvey, 2002). Ils sont codés par un groupe de neuf gènes : dont 5 gènes structuraux (*fimA*, *fimI*, *fimF*, *fimG*, *fimH*), une chaperonne (*fimC*), un portier (usher) (*fimD*) impliqué dans l'assemblage, ainsi que des recombinaisons (*fimB*, *fimE*) impliquées dans la régulation. Ils sont de forme cylindrique, mesurent 7 nm de diamètre environ et 1µm de longueur (Schilling *et al.*, 2001). Ils reconnaissent le D-mannose, chez les récepteurs protéiques glycosylés exprimés par certaines cellules eucaryotes, dont les érythrocytes, et peuvent se lier à différentes

structures cellulaires comme la fibronectine, la lamine, le collagène, etc (Bergsten. *et al.*, 2005). Cette capacité à se lier au D-mannose peut être utilisée *in vitro* afin de tester la présence du fimbriae type 1 à la surface des bactéries, avec un test d'agglutination aux levures. Ce test reste approximatif, mais permet de montrer la présence de fimbriae reconnaissant le D-mannose, dont le fimbriae de type 1. Plus les bactéries s'agglutinent aux levures, plus le fimbriae type 1 est produit et inversement (Korhonen, 1979, Mirelman *et al.*, 1980).

Lors d'ITU, le fimbriae de type 1 joue un rôle essentiel dans la capacité des souches UPEC à causer une infection. C'est le fimbriae le plus hautement exprimé lors d'une ITU précoce (Snyder *et al.*, 2005). Il semble important pour la colonisation de la vessie et semble plus particulièrement associé aux cystites (infection de la vessie) (Kaper *et al.*, 2004, Mulvey *et al.*, 1998). Il a été démontré qu'une souche UPEC déficiente dans la production de type 1 colonise moins bien la vessie que celles produisant le fimbriae (Crépin *et al.*, 2012b, Hultgren *et al.*, 1991).

1.5.4.2 Les Fimbriae P

Les fimbriae P sont encodés par un ensemble de onze gènes nommés *pap*. La structure des fimbriae P est semblable à celle du fimbriae de type 1, un filament cylindrique de 7 nm de diamètre. Le récepteur de ces fimbriae est le globotriaosylcéramique (GbO3) qui se trouve sur les érythrocytes et les cellules rénales de l'hôte. Ces fimbriae sont donc plus souvent associés aux pyélonéphrites (Bergsten. *et al.*, 2005, Mulvey, 2002).

1.5.4.3 Les fimbriae F1C

Les fimbriae F1C sont codés par le groupe de gènes *foc*. Ils peuvent se lier au β -GalNac-1 et au 4 β -Gal des glycolipides situés à la surface des cellules rénales. Il peut se lier aux cellules endothéliales du rein et de la vessie (Mulvey, 2002, Snyder *et al.*, 2005).

1.5.4.4 Co-régulation des fimbriae

Les souches UPEC peuvent posséder plus de 10 types de fimbriae (Welch et al., 2002). Cependant, ce sont des facteurs très immunogènes et les bactéries n'ont donc pas intérêt à en exprimer plusieurs à la fois. Leur expression est soumise à des mécanismes de co-régulation, cela permet aux bactéries d'exprimer les fimbriae appropriés au bon moment lors de la colonisation. Le tractus urinaire comporte plusieurs microenvironnements différents et les bactéries doivent pouvoir s'adapter à cette variété. Ce mécanisme leur permet d'adhérer aux différents tissus de l'hôte et de s'adapter à ces microenvironnements qu'elles rencontrent au cours des infections (Snyder et al., 2005). L'expression du fimbriae de type 1 affecte l'expression des autres fimbriae chez les UPEC. Certaines études ont démontré que lorsque les fimbriae de type 1 sont surexprimés *in vivo* au cours d'une ITU, l'expression des fimbriae P est régulée à la baisse. L'expression des fimbriae de type 1 affecte donc l'expression des fimbriae P de manière inverse. Ces études ont également démontré que chez la souche UPEC CFT073 n'exprimant ni les fimbriae de type 1 ni les fimbriae P, les fimbriae F1C y étaient surexprimés (Snyder et al., 2005). En cas de déficience des systèmes principaux d'adhésion, d'autres systèmes auxiliaires prennent le relais, montrant la co-régulation des fimbriae.

1.6 Les infections du tractus urinaire communautaires (ITU)

1.6.1 Généralités

Les infections du tractus urinaire (ITU) sont un ensemble d'infections bactériennes touchant les constituants du tractus urinaire. Les ITU communautaires sont des infections qui sont acquises en dehors d'un contexte hospitalier. On considère qu'il y a une ITU quand la bactériurie est positive, soit supérieure à 10^5 UFC/ml d'urine mise en culture (Unité Formatrice de Colonie). On distingue trois types d'infections : la cystite (infection de l'urine ou de l'épithélium vésical), pyélonéphrite (infection des reins) et la bactériurie asymptomatique (bactéries présentes dans l'urine en absence de symptôme) (Lobel *et al.*, 2007, Thirion *et al.*, 2003).

Aux États-Unis, les milliards de dollars annuels investis en dépenses de santé pour le traitement des ITU acquises en milieu communautaire s'expliquent par la redondance de cette infection. C'est l'infection bactérienne la plus commune après celle des poumons. Elle engendre plus de 7

millions de visites médicales en cabinet par année aux États-Unis et plus de 100 000 admissions hospitalières (Thirion *et al.*, 2003)

Les ITU touchent essentiellement les femmes, principalement dû au rapprochement des voies d'entrée, entre l'anus et l'entrée de l'urètre. 50 % d'entre elles auront au moins une fois un épisode d'ITU au cours de leur vie contre seulement 15 % des hommes (Lobel *et al.*, 2007). Ce sont les habitudes de vie qui jouent un rôle de facteur de risque chez la femme, telles les pratiques sexuelles (pas de miction après un rapport par exemple), une infection urinaire antérieure (ITU récurrente), la prise d'antibiotiques (résistance), l'utilisation de moyen de contraception physique (un diaphragme peut retenir les bactéries) (Thirion *et al.*, 2003). Les ITU dites non compliquées sont les cystites et pyélonéphrites chez les femmes de 15 à 65 ans, non enceintes, sans anomalie fonctionnelle ou malformation de tractus urinaire. Les ITU sont dites compliquées chez les femmes ayant une anomalie fonctionnelle ou anatomique du tractus urinaire, un système immunitaire affaibli (maladie systémique ou métabolique) ou quand l'infection est sévère (dégénération en septicémie, état de choc) (Lobel *et al.*, 2007).

Nous nous intéresserons aux ITU non compliquées dans cette étude. Les cystites et les pyélonéphrites peuvent être causées par plusieurs espèces bactériennes : *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella spp*, *Proteus mirabilis* (Gram négatif) ou *E. faecalis* (Gram positif). Cependant, 80 % à 85 % des ITU sont causées par les *Escherichia coli* uropathogènes ou UPEC (Russo *et al.*, 2003). Il n'existe pas encore de données québécoises sur les infections urinaires hors contexte hospitalier (Thirion *et al.*, 2003). Cependant, dans une étude ontarienne effectuée sur 2 000 isolats de patients ayant rendu visite à un omnipraticien, l'équipe de Tony Mazzulli *et al.*, 2001 a recensé qu' *E. coli* représentait 91,8 % des bactéries isolées, *Klebsiella pneumoniae* 3,9 % et *Proteus sp.* 2,0 %.

La bactériurie asymptomatique est causée par des bactéries de type ABU pour *asymptomatic bacteriuria*. Les patients porteurs d'ABU n'ont aucun symptôme et ne nécessitent pas de traitement. Les ABU présentent une diminution de leurs facteurs de virulence et agiraient comme commensaux dans la vessie. Elles aideraient à prévenir les infections urinaires par des pathogènes (Roos *et al.*, 2006a, Zdziarski *et al.*, 2008)

1.6.2 Colonisation du tractus urinaire par les UPEC

Chez les femmes, l'ITU la plus commune est de type ascendante (Kaper *et al.*, 2004, Lobel *et al.*, 2007) (voir Figure 1.5). Les bactéries atteignent la vessie via l'urètre. Le milieu permet la sélection des souches UPEC adaptées à la survie dans le tractus urinaire. Dans la vessie, elles peuvent adhérer aux cellules épithéliales grâce au fimbriae de type 1 et causer une cystite. Les symptômes associés sont des mictions douloureuses et à une grande fréquence (Kaper *et al.*, 2004, Lobel *et al.*, 2007). Parfois les UPEC arrivent à envahir l'urothélium et à y former des colonies bactériennes intracellulaires (CBI) - (Figure 1.6). Les bactéries adhèrent à l'uroplakine située à la surface des cellules uroépithéliales et provoquent un réarrangement de l'actine. Cela leur permet d'être internalisées par les cellules uroépithéliales grâce à des vacuoles. Elles peuvent s'y multiplier à l'abri du flux urinaire et du système immunitaire, sans être détectées par les neutrophiles. Il se forme alors des corps d'inclusions composés de milliers de bactéries quiescentes. Elles peuvent y demeurer plusieurs mois. Dans ces corps d'inclusions les CBIs forment des structures semblables à des biofilms et adoptent une forme coccoïde. Les bactéries peuvent se détacher des CBIs, reprendre une forme de bacille mobile et s'échapper de la cellule hôte. Les mécanismes sous-jacents sont encore mal connus. Lors de l'évasion les UPEC peuvent former des structures filamenteuses en s'agrégeant ensemble et se fixant sur les parois des cellules de la vessie, ce qui leur permet de lutter contre le flux urinaire. Elles peuvent infecter de nouveau d'autres cellules uroépithéliales. Les CBIs peuvent être éliminées lors de l'exfoliation des couches superficielles de l'urothélium, cependant les couches plus profondes sont alors exposées aux UPEC et peuvent être infectées à leur tour. La présence de bactéries intracellulaires est parfois la cause des infections urinaires récurrentes, souvent dues aux mêmes agents pathogènes qui réinfectent la vessie lors des phases d'évasion de la niche intracellulaire (Rosen *et al.*, 2007b).

Si l'infection n'est pas traitée, elle peut atteindre les reins, ce que l'on appelle pyélonéphrite. Grâce à leurs flagelles qui leur permettent de se déplacer, les UPEC peuvent migrer de la vessie aux reins via les uretères. Le fimbriae P leur permet d'adhérer aux cellules rénales (voir Figure 1.5). Des symptômes graves y sont associés tels que fièvre, vomissement, douleurs. Ultiment, les bactéries peuvent atteindre la circulation sanguine et causer une septicémie, c'est-à-dire une infection du sang, potentiellement fatale (Kaper *et al.*, 2004, Lobel *et al.*, 2007).

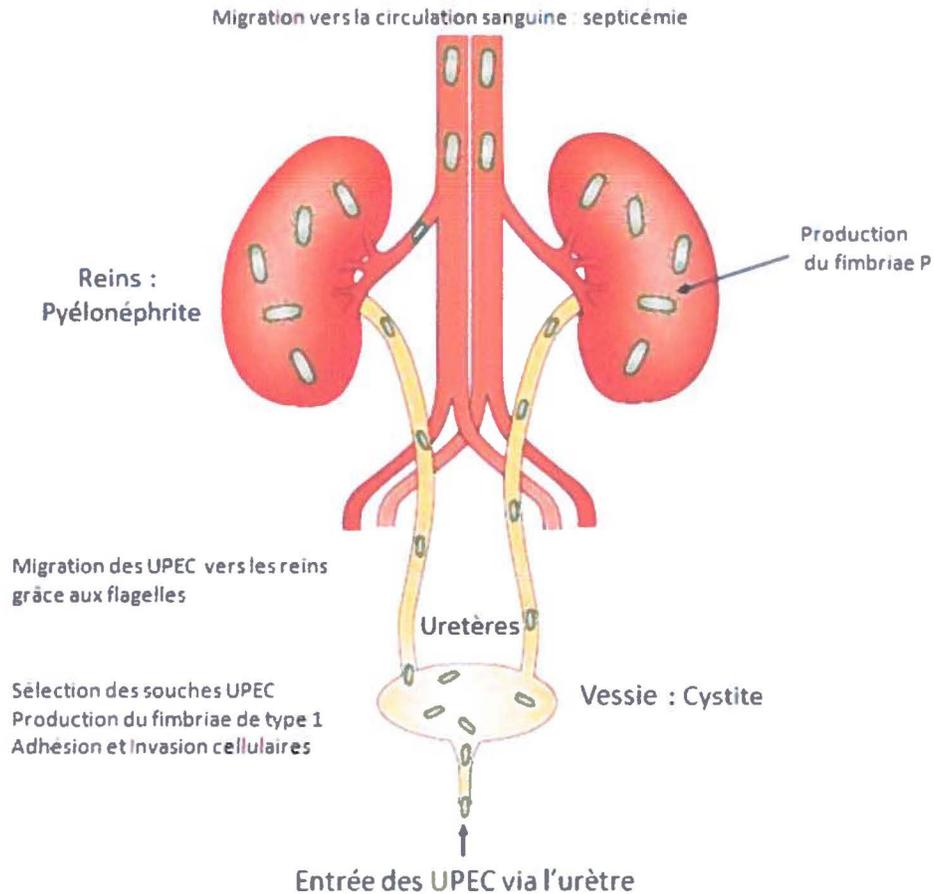


Figure 1.5 : Infection ascendante du tractus urinaire par les UPEC

Les UPEC entrent dans le tractus urinaire via l'urètre. Elles peuvent coloniser la vessie grâce au fimbriae de type 1 qui leur permet d'adhérer à l'urothélium, et causent une cystite. Si l'infection n'est pas traitée, les UPEC peuvent migrer vers les reins grâce aux flagelles, coloniser les cellules épithéliales des reins via leur fimbriae P et causer une pyélonéphrite. Ultiment elles peuvent atteindre la circulation sanguine et causer une septicémie, potentiellement fatale pour l'hôte (modifié de Kaper et al., 2004)

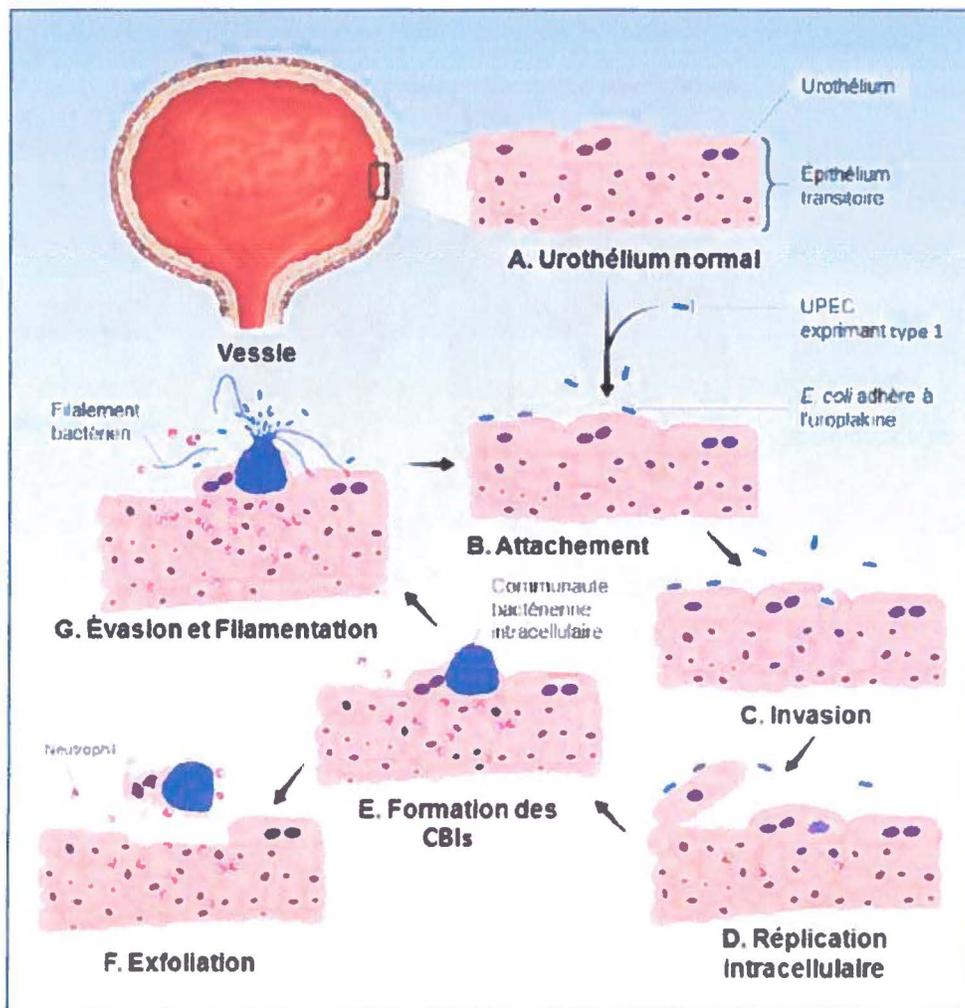


Figure 1.6: Cycle d'infection de la vessie par les UPEC formant des colonies bactériennes intracellulaires

(A et B) Les UPEC adhèrent à l'uroplakine à la surface à l'épithélium de la vessie grâce à leur fimbriae de type 1. (C) Elles peuvent ensuite envahir les cellules uroépithéliales après l'adhésion. (D) Elles vont se répliquer dans des vacuoles à l'intérieur des cellules, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire de l'hôte. (E) Elles forment des CBI dans des corps d'inclusion, les bactéries deviennent quiescentes, et peuvent y rester pendant plusieurs mois. (F) Les CBIs peuvent être éliminées lors de l'exfoliation des couches superficielles de l'urothélium. (G) Les bactéries peuvent s'échapper des CBIs, certaines adopteront une morphologie filamenteuse, et peuvent recommencer un nouveau cycle d'infection. (modifié de (Rosen *et al.*, 2007a)

1.6.3 Modèles d'infection et tests phénotypiques

Les modèles d'infection *in vivo* et *in vitro* sont utilisés afin d'approfondir les connaissances sur les ITU et les pathogènes impliqués.

1.6.3.1 Modèles *in vitro*

Des modèles *in vitro* peuvent être utilisés pour observer, chez les uropathogènes, des mécanismes impliqués lors d'une ITU. Ils tentent de reproduire les conditions environnementales que peuvent rencontrer les UPEC dans le tractus urinaire. Par exemple, la variation de l'expression de type 1 peut être observée grâce à une méthode de l'agglutination sur levure. Les levures comportent des résidus D-mannosylés à leur surface que reconnaissent les fimbriae de type 1. Donc plus les bactéries produisent du fimbriae de type 1, plus elles agglutinent aux levures (Mirelman *et al.*, 1980). Une technique plus précise est l'immunofluorescence. Les fimbriae sont couplés à un IgG portant un marqueur fluorescent permettant la visualisation des structures par microscopie (Nowicki, 1996). Des cellules en culture provenant d'organes ou de tissus impliqués dans une ITU (reins, vessie, érythrocytes) peuvent être aussi utilisées. Elles servent par exemple à étudier l'effet de la toxicité des souches, leur capacité d'adhésion, ou leur cycle d'infection sur les cellules testées (Guyer *et al.*, 2000, Roos *et al.*, 2006b). D'autres alternatives sont l'utilisation de milieux de culture proches de ceux que les UPEC peuvent rencontrer lors d'une ITU, comme l'urine ou encore le sang. Par exemple, l'équipe de Snyder *et al.*, 2004 a utilisé des puces spécifiques à ADN pour comparer l'expression des gènes de la souche UPEC CFT073 mise en culture en urine humaine, à celles mises en milieu de culture riche Luria Bertani (LB). Ils ont démontré que certains gènes, dont ceux associés aux systèmes de sidérophores, de la capsule, des fimbriae type 1, P et FIC, sont « hyper-régulés » chez la souche CFT073 en urine humaine, par rapport au milieu LB. Ce sont surtout des gènes codant pour des facteurs de virulence, montrant ainsi que le milieu du tractus urinaire influe sur l'expression des facteurs de virulence chez la souche UPEC testée.

1.6.3.2 Modèles *in vivo*

Les modèles animaux sont utilisés afin de se rapprocher des conditions rencontrées pendant les ITU chez l'humain. Ils permettent de faire des expériences qui ne peuvent pas être réalisées chez les humains (comme infecter puis disséquer un rein afin d'obtenir une coupe microscopique). Ils procurent de précieuses informations permettant de mieux comprendre les ITU. Les modèles animaux, connus pour être les plus représentatifs à ce jour pour une infection ascendante du tractus urinaire, sont les souris et les singes du fait de leur similitude entre leur tractus urinaire et celui des humains. Les souris représentent le premier choix pour la plupart des laboratoires, car elles sont moins dispendieuses, peuvent être fournies en grand nombre et demandent moins d'entretien (Johnson *et al.*, 1996). Un des modèles murins d'ITU est l'infection transurétrale, où les bactéries sont directement injectées dans la vessie des souris via leur urètre (Hung *et al.*, 2009). Les singes, à cause de leurs similarités avec les humains et leur coût très élevé, sont le plus souvent utilisés lors d'études cliniques afin de confirmer des résultats (Johnson *et al.*, 1996).

1.6.4 Traitement des infections urinaires non compliquées

À ce jour les ITU se soignent à l'aide d'antibiotiques. Les risques sont l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques, notamment parmi les bactéries de la flore intestinale, dont les UPEC. Ces résistances rendent les ITU plus difficiles à traiter. Les approches utilisées par les cliniciens qui permettent le choix des antibiotiques, doivent tenir compte de l'évolution de ces résistances (Thirion *et al.*, 2003) pour le traitement des ITU non compliquées l'IDSA (*The Infectious Diseases Society of America*) a mis à jour en 2010 les recommandations à adopter lors des approches de traitements empiriques (Gupta *et al.*, 2011). Dans cette section, on se concentrera sur l'utilisation des antibiotiques. Les modes d'action des antibiotiques cités ci-dessous n'y seront pas décrits, en raison de leur grand nombre.

L'IDSA conseille la nitrofurantoïne pendant 5 jours, le pivmecillinam pendant 3 à 7 jours ou la fosfomycine en une dose unique. Ces trois agents antimicrobiens sont recommandés uniquement dans le cas de cystites. Ce sont les seuls connus à ce jour pour ne pas provoquer de résistances croisées avec d'autres antibiotiques (Gupta *et al.*, 2011, Nicolle, 2011). L'utilisation des fluoroquinolones (3 à 7 jours de traitement), conseillée dans la mise à jour précédente est

maintenant découragée en première ligne ; et ce malgré le fait qu'ils peuvent être 5 % à 10 % plus efficaces que les antibiotiques cités précédemment. En effet ils ont naturellement tendance à induire des résistances croisées avec d'autres antibiotiques parmi les bactéries de la flore intestinale. De même, le triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP/SMX) (3 jours de traitement) n'est plus conseillé en première ligne, car la résistance de cet antibiotique a augmenté. Son utilisation est proscrite si la prévalence locale de résistance est connue et supérieure à 20 % (Gupta *et al.*, 2011, Nicolle, 2011) pour le traitement de pyélonéphrites, les fluoroquinolones telles ciprofloxacine, ofloxacine ou levofloxacine sont recommandées en première ligne (5 à 7 jours de traitement) (Gupta *et al.*, 2011).

Pour les ITU non compliquées récurrentes, un traitement prophylactique est conseillé. Il consiste en une faible dose donnée sur le long terme dont les types antibiotiques dépendent des souches impliquées (Gupta *et al.*, 2011).

L'émergence de bactéries résistantes au TMP/SMX et aux fluoroquinolones parmi les souches UPEC acquises en milieu communautaire, incluant les souches UPEC ESBL (extended spectrum β -lactamase), a changé les approches de traitements empiriques. Les ESBL possèdent des enzymes qui leur confèrent une résistance à plusieurs classes d'antibiotiques qui sont : les céphalosporines de 3e et 4e génération et les monobactames, incluant les co-résistances associées aux autres classes d'antibiotiques telles les fluoroquinolones, les cotrimoxazoles, les tétracyclines et les aminoglycosides. L'augmentation des résistances est majoritairement due à l'expansion d'un nombre restreint d'UPEC ayant acquis ces mutations. Les sérotypes de ses clones sont : 025:H4-ST 131, 015:K52:H1 et A (Kahlmeter *et al.*, 2012, Nicolle, 2011).

Dans cette étude nous nous intéressons aux mutations menant à la résistance à la fosfomycine chez les UPEC.

1.7 La fosfomycine (FO)

1.7.1 Historique

La fosfomycine (FO) est un antibiotique qui a été découvert pour la première fois par l'équipe du chercheur Hendlin en 1969. Originellement appelé phosphonomycine, il est produit par des souches de *Streptomyces* (Hendlin *et al.*, 1969). FO fait partie de la famille des acides phosphoniques. C'est un antibiotique à large spectre bactéricide, c'est-à-dire létal pour les bactéries. Il affecte des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Aujourd'hui il est produit de façon synthétique (Popovic *et al.*, 2010). L'un des revers à sa découverte fut son apparente difficulté à inhiber la croissance de bactéries pathogènes. Ce n'est qu'à partir de 1983 que les tests *in vitro* ont été standardisés par l'équipe du chercheur Andrews (Andrews *et al.*, 1983, Popovic *et al.*, 2010).

La formule de la fosfomycine est : $C_3H_7PO_4$. Elle forme facilement des sels. De façon intraveineuse FO est prise sous forme de sel disodique ($C_3H_5O_4PNa_2$). Elle est prise oralement associée à la trométhamine, ce qui facilite sa biodisponibilité ($C_7H_{18}NO_7P$) (Knottnerus *et al.*, 2008, Patel *et al.*, 1997) (Voir Figure 1.7).

La fosfomycine est actuellement commercialisée en médicament mono-dose de 3 g sous sa forme Fosfomycine- Tromethamine, en Europe, au Japon, en Afrique du sud, aux États-Unis et au Canada. Elle peut avoir le nom de « Monurol », « Manuril » ou « Uridoz » (Bruyère *et al.*, 2009, Popovic *et al.*, 2010, Triton-Pharma-Inc., 2012). FO est autorisée aux États-Unis depuis 1998 et utilisée en Europe depuis plus de 20 ans (Shrestha *et al.*, 2001). Cependant FO est recommandée aux États-Unis, comme option thérapeutique de première ligne pour le traitement des ITU, depuis 2010 seulement (Gupta *et al.*, 2011, Warren *et al.*, 1999). Il est disponible en pharmacie au Canada depuis 2012, distribué par la compagnie Triton Pharma Inc (Pharma-Direct, 2012, Triton-Pharma-Inc., 2012).

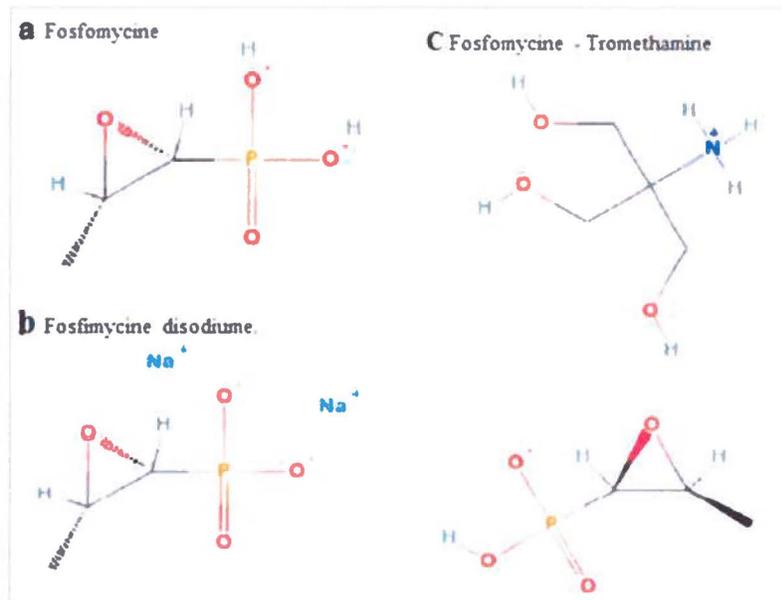


Figure 1.7 : Structure des différentes formes de la fosfomycine.
(Modifié de Popovic et al., 2010)

1.7.2 Mode d'action de la fosfomycine

Le mode d'action de la fosfomycine a été décrit pour la première fois en 1974 par l'équipe du chercheur Kahan (Kahan *et al.*, 1974). Cette molécule agit comme inhibiteur de la synthèse des peptidoglycanes, première étape indispensable à la synthèse de la paroi des cellules bactériennes, et à la survie des bactéries. Son action se produit dans le cytoplasme. Pour cela elle doit pouvoir pénétrer à l'intérieur de la cellule. FO utilise deux modes de transport afin d'entrer dans les cellules bactériennes, le transporteur facultatif d'hexose phosphate (UhpT) et le transporteur constitutif de glycérophosphates (GlpT). UhpT dépend de la présence de glucose- 6-phosphate (G6P) pour être activé. GlpT laisse entrer le glycérol-3-phosphate (G3P) de façon constitutive (Kahan *et al.*, 1974, Shrestha *et al.*, 2001). Une fois à l'intérieur, FO se lie à la cystéine 115 de l'enzyme UDP-N-acétylglucosamine (MurA) et l'inactive. Elle bloque ainsi de façon irréversible la formation d'UDP-N-acétyl-muramique (précurseur des peptidoglycanes) à partir de l'UDP-N-acétylglucosamine (UDP-GNAc). Elle compétitionne avec le phosphoénolpyruvate (PEP), le substrat naturel de MurA, pour se lier à Cys115 (Kahan *et al.*, 1974, Karageorgopoulos *et al.*, 2012, Shrestha *et al.*, 2001) - (Voir Figure 1.8).

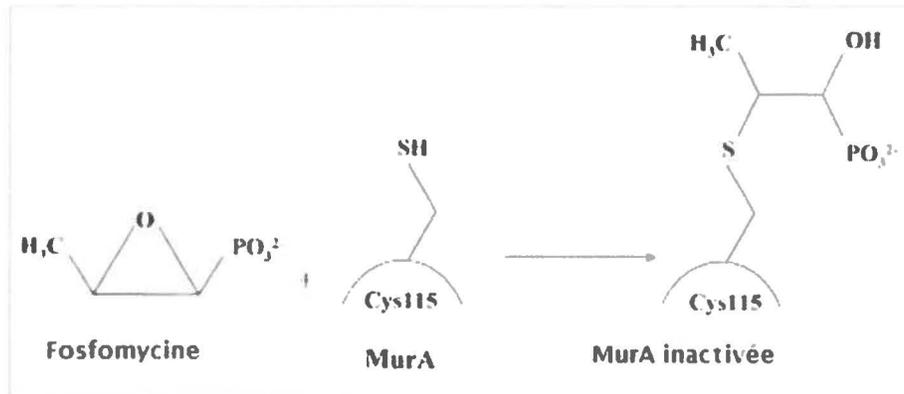


Figure 1.8 : Liaison entre MurA et la fosfomycine

La fosfomycine forme une liaison covalente avec le résidu Cys115 de l'enzyme MurA, et l'inactive (Modifié de El Zociby *et al.*, 2003)

1.7.3 La fosfomycine comme traitement des infections du tractus urinaire non compliquées

La fosfomycine est conseillée comme traitement de première ligne pour les ITU non compliquées, depuis 2010 aux États-Unis, comme mentionné dans la section précédente. Le peu d'intérêt pour FO provenait de deux faits majeurs. Premièrement, les données à l'époque ne permettaient pas d'établir l'efficacité significative de FO par rapport aux antibiotiques déjà utilisés (Gupta *et al.*, 2011). Deuxièmement, les études *in vitro* montrent que les UPEC ont une fréquence de mutation spontanée menant à la résistance à fosfomycine très élevée (10^{-2}). Les mutants résistants à FO se développent rapidement *in vitro* (Karageorgopoulos *et al.*, 2012, Nilsson *et al.*, 2003). Paradoxalement, les études cliniques montrent qu'il y a une faible fréquence d'apparition des mutations (10^{-7} à 10^{-8}) *in vivo*. De plus, la prévalence de résistance à FO reste faible et stable parmi les souches isolées de cas cliniques. Elle demeure entre 1 % et 3 % après plus de 20 ans d'utilisation en Europe (Cueto *et al.*, 2006, Karageorgopoulos *et al.*, 2012, Nilsson *et al.*, 2003), alors que celle des TMP/SMX peut dépasser 20 % (Gupta *et al.*, 2011, Nicolle, 2011). Les résultats *in vitro* ne coïncident pas avec ceux *in vivo*.

Une hypothèse expliquant cette différence serait que les mutations de résistance à la fosfomycine affaibliraient les UPEC (Nilsson *et al.*, 2003). Certaines études *in vitro* semblent supporter cette hypothèse. Elles montrent que certaines souches UPEC résistantes à la fosfomycine ont une croissance ralentie, et une capacité d'adhésion aux cellules uroépithéliales diminuée, comparée aux souches sensibles (Karageorgopoulos *et al.*, 2012, Marchese *et al.*, 2003). On parle de « coût biologique » dû aux mutations menant à la résistance à la fosfomycine (Nilsson *et al.*, 2003).

L'émergence de souches multi-résistantes a suscité le regain d'intérêt pour cette molécule. En effet, plusieurs études ont démontré que 90 % d'isolats d'uropathogènes ESBL sont sensibles à FO. Ces données ont supporté l'utilisation de cet antibiotique pour traiter les ITU. Des informations sur l'utilisation lors de cas clinique d'infection par de tels pathogènes sont encore limitées (Cueto *et al.*, 2006, Falagas *et al.*, 2010). Les critères de sensibilité sont sujets à des variations. Selon l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing*) les souches d'*E. coli* sont considérées sensibles si leur CMI (Concentration Minimale Inhibitrice) est inférieure ou égale à 32 mg/L. Selon le CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) les souches d'*E. coli* sont considérées sensibles si leur CMI est inférieure ou égale à 62 mg/L (CLSI *et al.*, 2013, EUCAST *et al.*, 2013).

FO est rapidement et entièrement excrétée dans le tractus urinaire. Les études précédentes ont montré qu'il ne modifie pas la flore intestinale. Les *E. coli* du tractus intestinal demeurent non résistants à FO après un traitement (Karageorgopoulos *et al.*, 2012). FO se retrouve en grande concentration (1000 mg/l) dans l'urine 2 à 4 heures après ingestion des 3 g réglementaire. Cette dose est létale pour *E. coli*. Il persiste 100µg/ml 20 à 26 heures après ingestion, et 10 µg/ml jusqu'à 72 à 82 suivant la prise du médicament. Selon la FDA (*Food Drug Administration*), l'absorption de nourriture n'influence pas l'efficacité de FO, car les concentrations demeurent élevées dans l'urine (CLSI *et al.*, 2013, FDA *et al.*, 2011, Scortti *et al.*, 2006).

En résumé, FO possèdent donc plusieurs caractéristiques qui en font un antibiotique de premier choix contre les ITU non compliquées. Cet antibiotique peut être administré en une seule dose. Les *E. coli* uropathogènes multirésistants émergents semblent y être sensibles. Il ne présente pas de mutations croisées de résistance avec d'autres antibiotiques n'a pas d'effet sur la flore intestinale et se retrouve en quantité létale pour les UPEC dans l'urine.

1.7.4 Résistances à la fosfomycine chez les UPEC

Les mutations conférant la résistance à la fosfomycine peuvent se trouver sur un plasmide ou sur le chromosome. Nous nous attarderons de façon plus approfondie sur les mutations chromosomiques, car c'est le sujet d'intérêt de cette étude.

1.7.4.1 Mutations de résistance plasmidiques

La présence de plasmide de résistance chez les souches UPEC a été rapportée avec celle du gène *fosA*. Ce gène proviendrait originellement de souches de *Streptomyces*. Ces dernières produisent de la fosfomycine naturellement. Il aurait été acquis par les UPEC grâce à des mécanismes de transfert de gène horizontal (voir section 1.4.1). Le gène *fosA* code pour une enzyme qui inactive la fosfomycine une fois entrée dans la cellule. Ce plasmide a été observé en Europe, où FO est utilisée depuis de nombreuses années. Cependant, les souches porteuses de ce plasmide sont rares. Il existe également un autre plasmide portant le gène de résistance *fosB*, ayant la même origine et action que *fosA*, mais qui est retrouvé, à ce jour, uniquement chez des souches de *Staphylococcus* (Popovic *et al.*, 2010, Suarez *et al.*, 1991).

1.7.4.2 Mutations de résistance chromosomiques

Les mutations de résistance à FO sur le chromosome sont les plus fréquentes. Deux systèmes de transport sont impliqués dans l'importation de FO dans la cellule bactérienne, GlpT et UhpT. Une altération de ces systèmes ou de leurs mécanismes de régulation peut conduire à la résistance à FO, car l'antibiotique ne peut plus entrer dans la cellule. Une diminution des quantités intracellulaires d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique), amène à une diminution de l'expression des transporteurs UhpT et GlpT, et donc à la résistance à la FO. Donc des systèmes affectant le niveau d'AMPc peuvent aussi augmenter la résistance à la FO (Karageorgopoulos *et al.*, 2012, Popovic *et al.*, 2010, Shrestha *et al.*, 2001).

Le gène *ptsI*, codant pour la phosphoénole pyruvate transférase, agit indirectement sur le niveau d'AMPc et le gène *cyaA*, codant pour l'adénylate cyclase, agit directement sur la production de AMPc. Une mutation dans l'un ou l'autre de ces gènes peut induire une baisse du niveau

intracellulaire d'AMPc et donc mener à la résistance à FO (Karageorgopoulos *et al.*, 2012, Popovic *et al.*, 2010, Shrestha *et al.*, 2001) (Voir Figure 1.9).

Des mutations peuvent survenir au niveau de l'enzyme MurA, où se fixe FO. La principale mutation connue à ce jour mène à un remplacement de la Cys-115 (site de liaison de FO) par un aspartate (Cys115Asp) et empêche la fixation de FO. D'autres mutations, Asp369Asn et Leu370Ile, ont aussi été rapportées comme menant à la résistance à la fosfomycine. Le gène *murA* est un gène essentiel, alors une souche ayant une délétion de ce gène serait non viable. Les mutations menant à la résistance à la FO survenant dans ce gène n'éliminent pas la fonctionnalité de l'enzyme (Karageorgopoulos *et al.*, 2012, Takahata *et al.*, 2010).

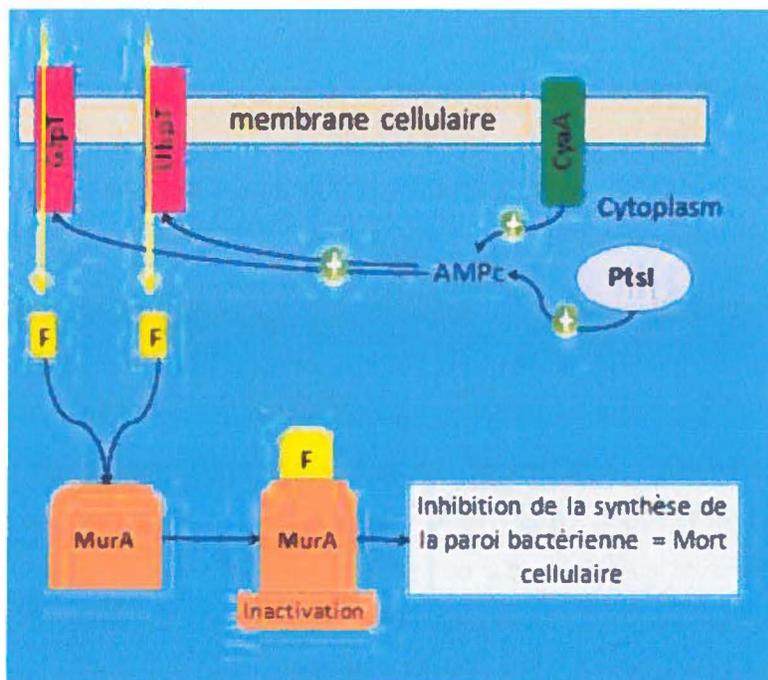


Figure 1.9 : Interaction entre les différentes protéines impliquées dans la résistance à la fosfomycine

L'adénylate cyclase (CyaA) et la phosphoénole pyruvate transférase (PtsI) active la production d'AMPc (adénosine monophosphate cyclique). Quand l'AMPc atteint un certain seuil, il active l'expression des transporteurs de sucrophosphates GlpT et UhpT, par lesquels la fosfomycine (F) est importée. La fosfomycine inactive l'enzyme MurA et de même la synthèse de la paroi bactérienne. Cela conduit à la mort cellulaire.

1.8 Systèmes impliqués dans la résistance à la fosfomycine

Les mutations procurant une résistance à la fosfomycine touchent principalement les gènes *ptsI*, *glpT*, *uhpT*, *cyaA*, et *murA*. Chacun est impliqué dans des systèmes de régulation différents et code pour différentes protéines.

1.8.1 PtsI

Le carbone est le composant chimique principal pour tous les êtres vivants connus. Les sources de carbone sont variables d'un milieu à un autre, mais les sucres constituent une des formes préférées de sources de carbones. La survie des bactéries dépend de leurs capacités à pouvoir importer et utiliser ces sources de carbone. Le système Pts, pour transporteurs de sucres phosphates, est un système majeur impliqué dans la détection, le transport, la phosphorylation des carbohydrates (sucres) et la signalisation cellulaire associée. La membrane cellulaire est imperméable aux sucres phosphorylés, donc une fois phosphorylés dans la cellule ils y restent. Le système Pts est impliqué dans le contrôle de la chimiotaxie, mécanisme qui permet à la bactérie de détecter les variations de leur milieu, ici la source de carbone (Boles *et al.*, 2004, Voet *et al.*).

Chez *E. coli*, le système Pts regroupe un ensemble de 5 enzymes : Enzyme I (EI) codé par *ptsI*, HPr codé par *ptsH*, Enzyme IIA (EIIA) codé par *crr*, Enzyme IIB (EIIB) et Enzyme IIC (EIIC). Elles interviennent dans une cascade de phosphorylation, transférant un phosphate du phosphoénol pyruvate (PEP) à un nouveau sucre. Les gènes *ptsI*, *ptsH*, et *crr* sont co-transcrits (De Reuse *et al.*, 1988) (voir Figure 1.10). L'expression des gènes codant pour un transporteur spécifique à un sucre est co-régulée par ce système, avec ceux codant pour l'utilisation de ce sucre. EI et HPr sont les deux composants généraux redondants. EIIA, EIIB et EIIC sont spécifiques aux sucres transportés. EIIA et EIIB sont impliquées dans le transfert du phosphate et EIIC est une protéine membranaire (Boles *et al.*, 2004, Plumbridge, 2002).

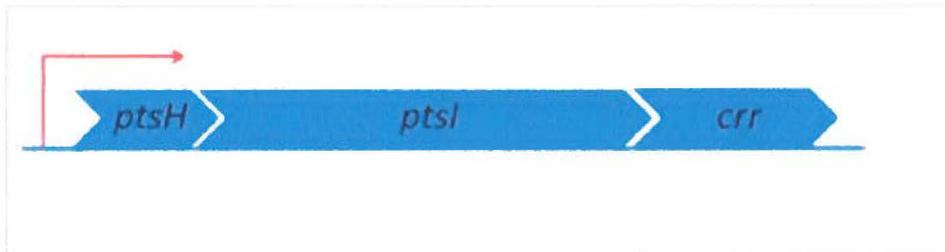


Figure 1.10 : Schéma de l'opéron pts

Lors de la cascade de phosphorylation, le phosphate est transféré du phosphoénol pyruvate (PEP) à EI, puis HPr, ensuite EIIA, puis EIIB et EIIC. Le glucose est le sucre utilisé en priorité par les bactéries et son utilisation est liée à celle du lactose. En absence de glucose, le système Pts active le transporteur de lactose (sucre secondaire), la lactose perméase. En absence de lactose, il va aussi activer l'expression des gènes des transporteurs de sucres secondaires, selon ceux présents dans le milieu. Lorsque le glucose est internalisé via EIIC, il est phosphorylé en Glucose-6-Phosphate (G6P), impliqué dans de nombreuses voies métaboliques. Le ratio entre EIIA (non phosphorylé) et EIIA phosphorylé (EII-P) reflète l'état physiologique de la cellule. En effet en présence de glucose la cellule a une activité métabolique élevée. Ainsi, il y a plus de EII que de EIIA-P, car le phosphate est rapidement transféré de EIIC-P au glucose. En absence de glucose, EIIA-P active l'adénylate cyclase permettant la synthèse d'AMPc. L'AMPc se lie au régulateur de transcription CRP (*cAMP regulator protein*). Le complexe AMPc-CRP activera la synthèse des gènes de transporteurs d'autres sucres phosphate (mannose, fructose, sorbitol, etc) et donc les systèmes Pts et associés, ainsi que les gènes nécessaires à l'utilisation de ceux-ci (Boles *et al.*, 2004, Plumbridge, 2002.) (Voir Figure 1.11).

De ce fait, des mutations dans le gène *ptsI* peuvent entraîner indirectement une diminution d'AMPc dans la cellule en absence de glucose. Il en résulterait une diminution de la capacité de la cellule à détecter et utiliser certaines sources de carbone dans le milieu, comme le mannose, le sorbitol ou encore le fructose.

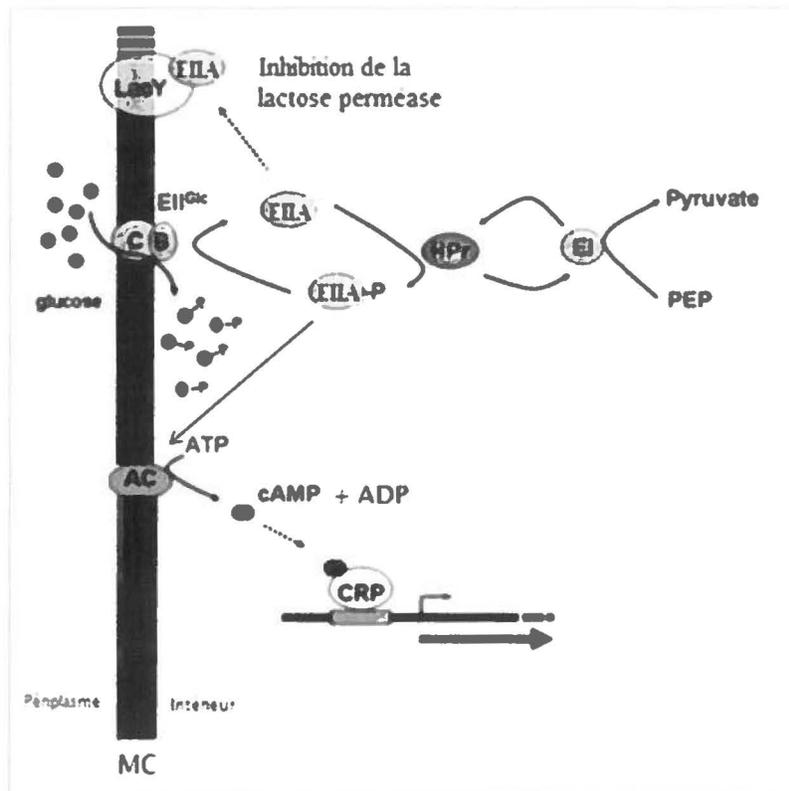


Figure 1.11 : Cascade de phosphorylation entre les différents composants du système Pts en présence de glucose

Cascade de phosphorylation : le phosphate est transféré du phosphoénol purvate (PEP) à EI, HPr, EIIA, EIIB puis EIIC. Le glucose entre dans la cellule via EIIC et y est phosphorylé en glucose-6-phosphate. En présence de glucose, EIIA inhibe la lactose perméase. En absence de glucose, EIIA-P active l'adénylate cyclase qui catalyse la synthèse d'AMPc (AC) à partir d'ATP et libère de l'ADP (Adénosine diphosphate). Le complexe AMPc-CRP active la synthèse de gènes de transport de sucres secondaires et les systèmes PTS associés. Abréviations : MC : membrane cellulaire (modifié de Boles et al., 2004),

1.8.2 GlpT

Le transporteur GlpT fait partie de la sous-famille des OFA (Antitransporteurs phosphates/Organophosphates), membre des MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Cette famille de protéines peut transporter uniquement de petites molécules en réponse à un gradient chimiotactique (Pao *et al.*, 1998). Il permet le transport du glycérol-3-Phosphate (G3P), un intermédiaire essentiel de la glycolyse et de la biosynthèse des phospholipides. Il constitue la base de tous les phospholipides et de tous les groupes polaires phosphatidylglycerols et cardiolipines nécessaires au fonctionnement cellulaire. La fosfomycine peut également entrer dans la bactérie via ce transporteur (Lemieux *et al.*, 2004).

1.8.2.1 Régulation

Le système Glp inclut les gènes impliqués dans le transport, et l'homéostasie du G3P dans la cellule, afin qu'il soit toujours disponible au besoin. Les gènes impliqués dans le transport de G3P se trouvent sur deux opérons. Le gène *glpT*, codant pour le transporteur, GlpT, se trouve sur l'opéron *glpTQ*. Le gène *glpQ* code pour une enzyme, la glycérophospho-diestérase. Cette enzyme se trouve dans le périplasma. Elle hydrolyse les glycérophosphodiester et libère du G3P, qui est tout de suite internalisé via GlpT. L'opéron *glpTQ* est sujet à une répression catabolique. Son répresseur est la protéine GlpR, codée par le gène *glpR* sur l'opéron *glpEGR* (Timothy *et al.*, 1992) (Voir Figure 1.12). Le gène *glpE* code pour une sulfure transférase et son rôle dans la cellule n'a pas encore été déterminé (Ray *et al.*, 2000). Le gène *glpG* code pour une protéase. Elle coupe entre les résidus sérine et asparagine dans les régions hautement hydrophobe des protéines intramembranaires. Elle serait impliquée dans la protéolyse intramembranaire régulée (Maegawa *et al.*, 2005).

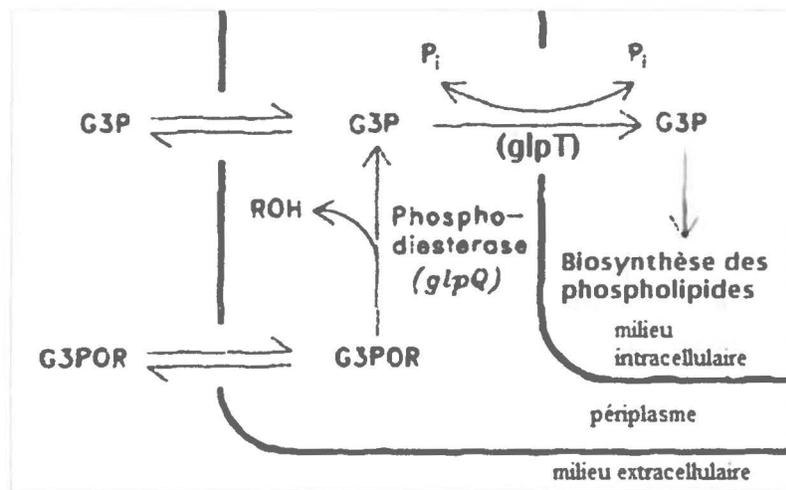


Figure 1.12 : Entrée du glycérol-3-phosphate dans la cellule via son transporteur GlpT

La phosphodiesterase hydrolyse les phosphodiesters et libère un alcool + un glycérol-3-phosphate (G3P). Le G3P entre dans la cellule via son transporteur GlpT. Les gènes sont notés entre parenthèses sur le schéma. (modifié de Timothy et al., 1992)

La transcription de l'opéron *glpTQ* est sujette à la répression catabolique. Elle est contrôlée majoritairement par trois types de stimuli. Le répresseur GlpR empêche la transcription en se fixant sur le promoteur. Son affinité diminue lorsqu'il est couplé au G3P. Donc le G3P régule positivement la transcription du gène. Son opéron est régulé positivement par le complexe CRP-AMPC, un régulateur de l'expression génique mentionné dans la section précédente. La transcription de l'opéron *glpTQ* est sujette à la répression catabolique pendant la phase de croissance des bactéries en présence de glucose, où le niveau d'AMPC diminue (Voir section 1.8.1). Le complexe CRP-AMP et le répresseur se fixent tous les deux sur la même région du promoteur de l'opéron (Lemieux *et al.*, 2004, Timothy *et al.*, 1992) (Voir Figure 1.13).

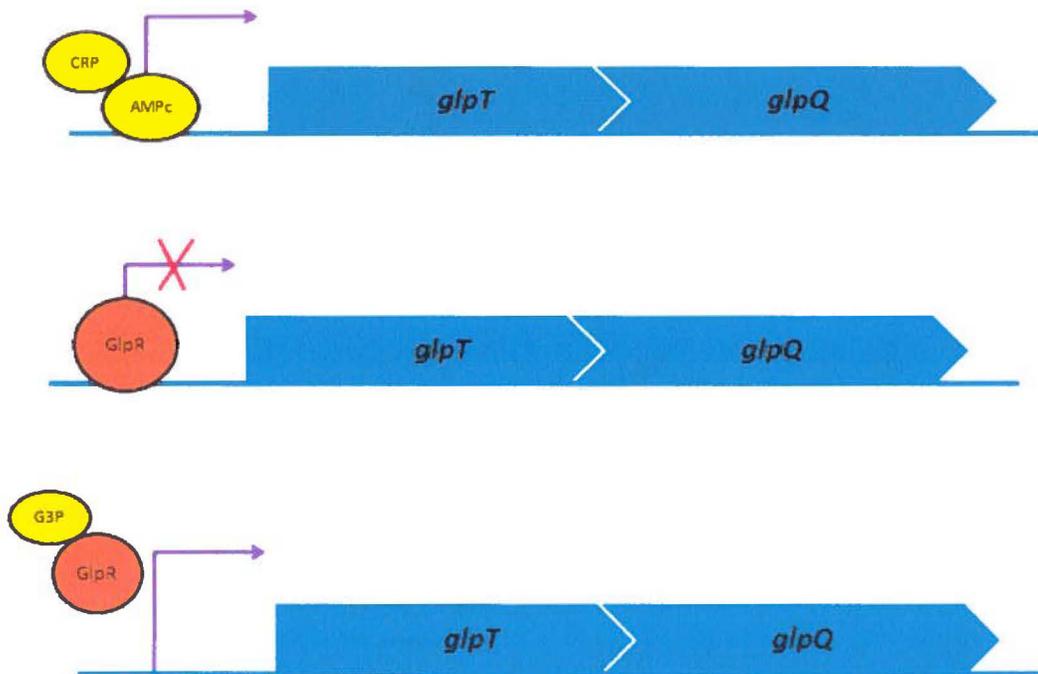


Figure 1.13 : Régulation de l'opéron *glpTQ*

Le complexe CRP-AMPC active la transcription et le répresseur GlpR la réprime. Le glycérole-3-phosphate (G3P) se fixe sur le GlpR. Son activité est ainsi diminuée et il ne réprime pas la transcription. CRP-AMPC et GlpR se fixent sur la même région du promoteur de l'opéron (Lemieux *et al.*, 2004).

1.8.2.2 Structure et Mécanisme d'action

Le transporteur GlpT est une protéine de 452 acides aminés, à 12 hélices transmembranaires notées de H1 à H12. Il est ouvert constitutivement dans le cytosol, où se trouve les extrémités C-terminale et N-terminale. Les hélices impliquées dans la formation du pore sont H1, H4, H7 et H10. La liaison au substrat se fait au niveau de l'arginine en position 45 (R45) située sur H1 et l'arginine en position 269 (R269) sur H7. R45 et R269 sont des résidus indispensables au transport du substrat (Huang *et al.*, 2003) (Voir Figure 1.14).

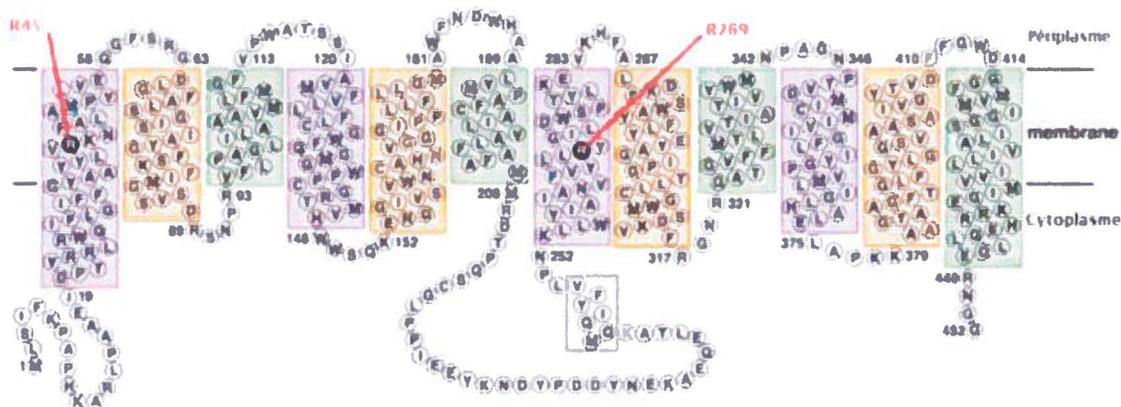


Figure 1.14 : Structure du transporteur GlpT

GlpT se compose de 12 hélices transmembranaires (H1 à H12). H3, H6, H9 et H12 ne sont pas impliquées dans sa formation (vert). H2, H5, H8 et H11 longent l'extérieur du pore (orange). H1, H4, H7 et H10 composent le pore (violet). Les résidus arginine R45 et R269 sont les sites de fixation du substrat (modifié de Huang et al., 2003)

Le G3P peut se fixer au transporteur grâce à son groupement phosphate qui reconnaît le site de liaison. Il en est de même pour la fosfomycine qui peut rentrer dans la cellule via GlpT grâce à son groupement phosphate et sa petite taille (Voir Figure Figure 1.7 et section 1.7.2). Le G3P est transporté dans la cellule en échange d'un phosphate inorganique (Pi), selon un gradient chimique. Le mécanisme de transport de GlpT est de type interrupteur à bascule. Un Pi se fixe sur le site de liaison dans le cytoplasme au niveau des résidus R45 et R269. Cela implique un changement de conformation de la protéine qui bascule vers le périplasm. Le Pi y est relâché et le G3P peut se fixer sur le site de liaison. Cela produit un changement de conformation, le transporteur bascule vers le cytoplasme et y relâche le G3P (Lemieux *et al.*, 2004) (Voir Figure 1.15).

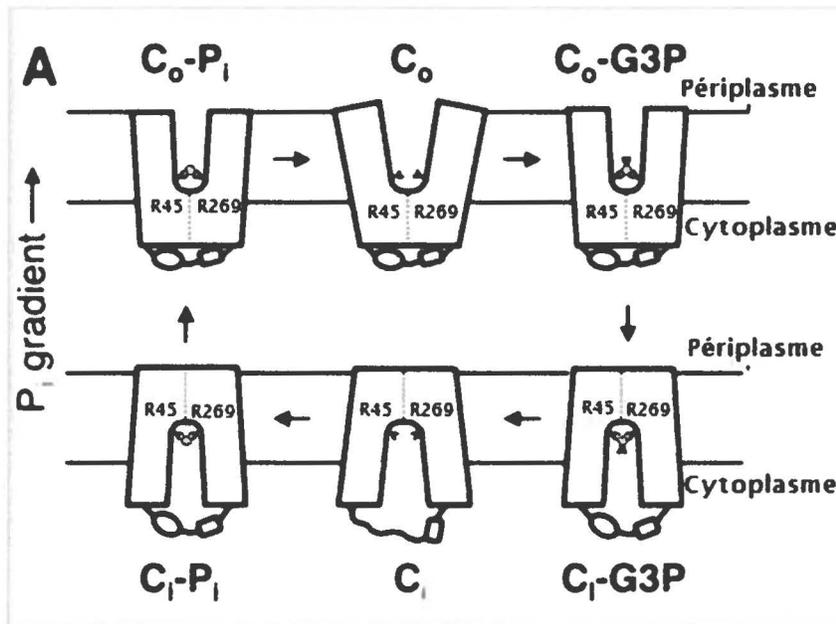


Figure 1.15 : Mode de translocation « interrupteur à bascule » du transporteur GlpT

Un phosphate inorganique (P_i) cytoplasmique se fixe sur le site de liaison du transporteur, au niveau des résidus R45 et R269. Le transporteur bascule vers le périplaste et y relâche le P_i . Ce gradient permet le positionnement du transporteur en position ouvert dans le périplaste et le G3P peut se fixer sur le même site de liaison que le P_i . Le transporteur bascule ensuite vers le cytoplasme et y relâche le G3P. (Modifié de Lemieux et al., 2005)

1.8.3 UhpT

La membrane bactérienne est imperméable aux sucres phosphorylés. Elle a donc besoin de transporteurs permettant leur importation. Le système Uhp (*Uptake of Hexose Phosphate*) permet l'entrée de plusieurs hexoses sous forme d'ester phosphate (galactose, glucose, fructose, mannose et mannitol), via le transporteur UhpT, en échange de phosphate inorganique. Les hexoses phosphates sont des intermédiaires de plusieurs voies métaboliques. Ce système est sous le contrôle du groupe de gène *uhpABC* (Barton, 2005, Kadner et al., 1993).

1.8.3.1 Régulation

Le gène *uhpT* code pour le transporteur secondaire UhpT, qui fait partie de la sous-famille des anti-transporteurs phosphate/organophosphates (OFA), membre des MFS (*Major Facilitator Superfamily*). Ils sont capables de transporter uniquement des petites molécules en réponse à un gradient chimiotactique (Stephanie S. Pao et al., 1998). L'inducteur du système Uhp est le glucose-6-phosphate qui se trouve dans l'environnement (G6P) (Barton, 2005).

Les gènes *uhpB* et *uhpC* codent pour des protéines membranaires UhpB et UhpC, tandis que le gène *uhpA* code pour une protéine extracellulaire qui sert de modulateur de réponse. UhpC détecte les niveaux extracellulaires de G6P et active UhpB qui s'autophosphoryle. UhpB phosphorylé (UhpB-P) transférera son phosphate à UhpA (UhpA-P), qui pourra ainsi se lier au promoteur du gène *uhpT* (Kadner, 1993). UhpA-P nécessite la fixation de l'activateur CRP-AMPC afin d'induire la transcription du gène *uhpT* et de permettre l'expression du transporteur UhpT (Voir Figure 1.16) - (Barton, 2005, Kadner *et al.*, 1993)

Ainsi, de même que pour le gène *glpT*, une diminution des niveaux d'AMPC ou une mutation du gène *uhpT* peuvent entraîner une diminution de la capacité cellulaire à incorporer le G6P et de même la fosfomycine. Une diminution de l'entrée de la fosfomycine pourra donc augmenter la résistance à l'antibiotique.

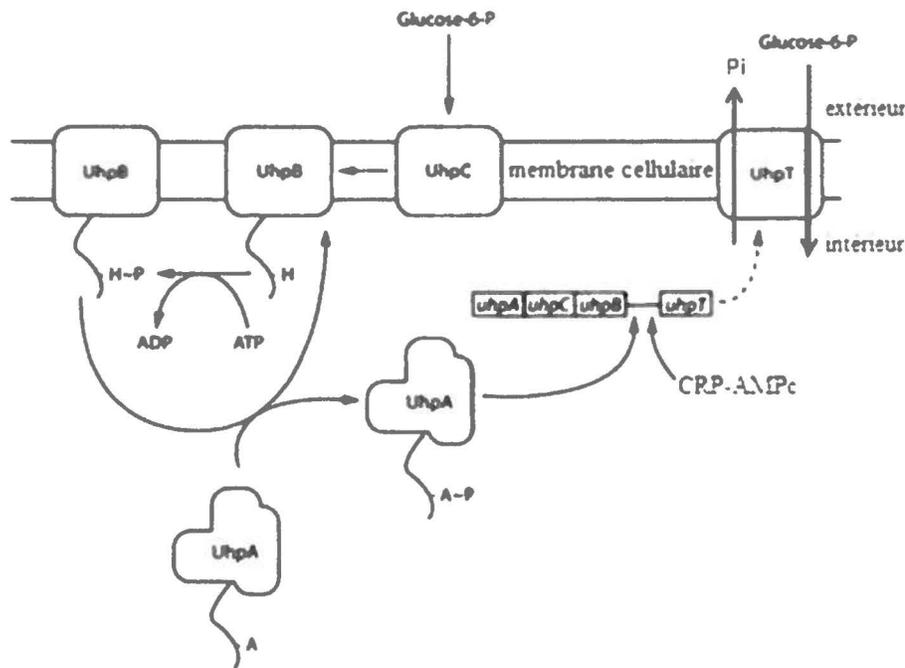


Figure 1.16 : Régulation des gènes menant à l'expression du transporteur UhpT

UhpC détecte le glucose-6-P dans le milieu extracellulaire, et coordonne l'autophosphorylation de UhpB au niveau d'un résidu histidine. Ce dernier transfère le phosphate à UhpA (UhpA-P) qui va pouvoir se fixer sur le promoteur de UhpT. UhpA-P lié à CRP-AMPc active la transcription du gène UhpT et l'expression du transporteur associé. Il permet l'entrée de G6P en échange d'un phosphate inorganique (Pi) (Modifié de Barton, 2005)

1.8.3.2 Structure et Mécanisme d'action

GlpT et UhpT sont des homologues. Leur structure et leur mécanisme d'action sont similaires. Le transporteur UhpT est une protéine de 463 acides aminés. Tout comme GlpT, elle possède 12 hélices transmembranaires notées de H1 à H12. Le transporteur est ouvert constitutivement dans le cytosol, où se trouve les extrémités C-terminale et N-terminale. La liaison au substrat se fait au niveau de l'arginine en position 46 (R46) située sur H1 et l'arginine en position 275 (R275) sur H7. Les résidus R46 et R275 sont indispensables au transport du substrat (Hall, 1999) et sont les homologues des résidus R45 et R269 chez le transporteur GlpT (Fann *et al.*, 2003) (voir Figure 1.17).

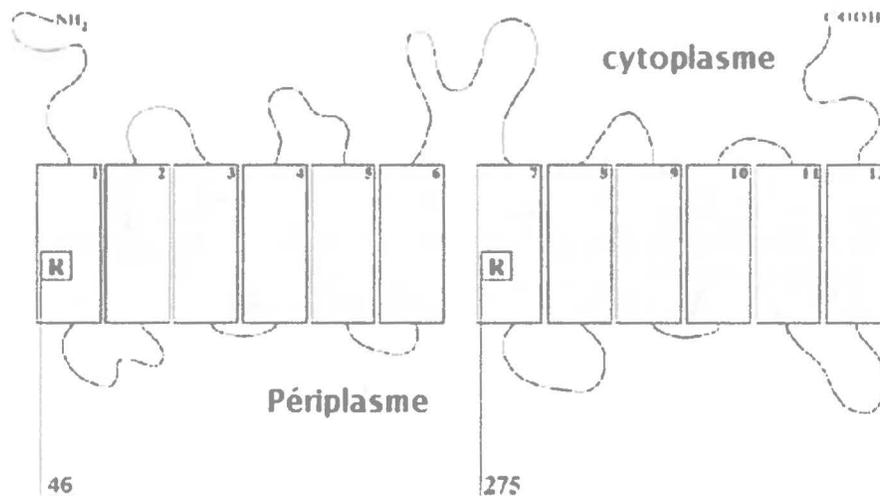


Figure 1.17 : Structure du transporteur UhpT

UhpT se compose de 12 hélices transmembranaires (H1 à H12). Les résidus arginine R46 et R275 sont les sites de fixation du substrat, respectivement sur H1 et H7 (Modifié de Huang *et al.*, 2003).

Le G6P et la fosfomycine (Voir section 1.7.2) peuvent entrer via le transporteur UhpT grâce à leur groupement phosphate et leur petite taille. Selon le même mode de mouvement « interrupteur à bascule » que GlpT, le G6P est transporté en échange d'un phosphate inorganique Pi. Les résidus R45 et R269 sont les sites de fixation au substrat. Cela implique un changement de conformation de la protéine qui bascule vers le périplasm. Le Pi y est relâché et le G6P peut se fixer sur le site de liaison. Cela produit un changement de conformation, le transporteur bascule vers le cytoplasme et y relâche le G6P (Lemieux *et al.*, 2004) (Voir Figure 1.18).

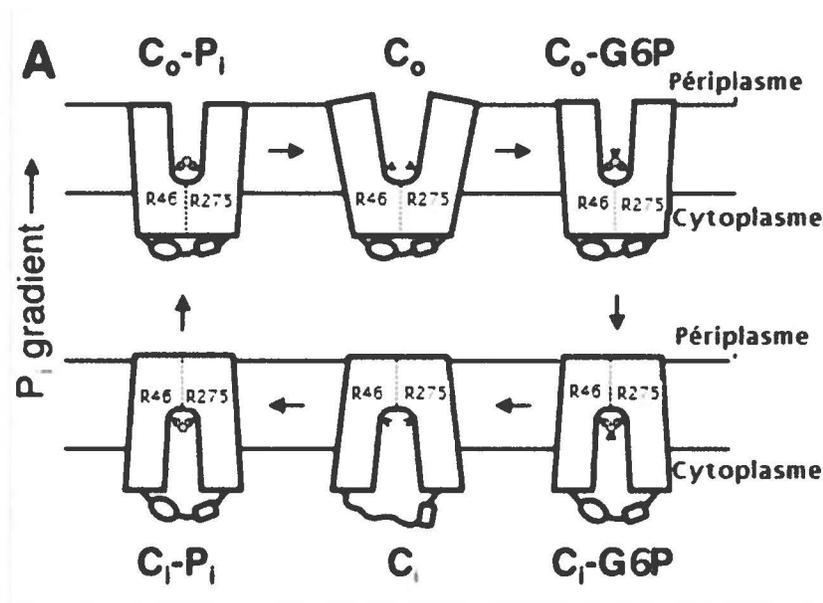


Figure 1.18 : Mode de translocation « interrupteur à bascule » du transporteur UhpT

Le gradient de phosphate inorganique (P_i) permet le positionnement du transporteur en position ouvert dans le périplasmе et le glucose-6-phosphate (G6P) peut se fixer sur le même site de liaison que le P_i . Le transporteur bascule ensuite vers le cytoplasme et y relâche le G6P. Système homologue du système de transport du Glycérol-3-phosphate. (Modifié de Lemieux et al., 2005)

Ainsi, une diminution des niveaux d'AMPC, une mutation du gène *glpT* ou *uhpT* peuvent entraîner une diminution de la capacité cellulaire à incorporer le G3P, le G6P et de même la fosfomycine. Ce qui peut aboutir à la résistance à l'antibiotique.

1.8.4 CyaA

Le gène *cyaA* code pour l'adénylate cyclase une enzyme transmembranaire qui catalyse la conversion d'ATP (adénosine triphosphate) en 3',5'-AMPC plus ADP (adénosine diphosphate), (voir Figure 1.11). L'AMPC est une molécule de régulation qui joue un rôle majeur dans la régulation métabolique et l'expression de nombreux gènes, codant notamment pour des transporteurs de sucres secondaires (maltose, fructose, etc) (Purich *et al.*, 2003). Il est impliqué dans la régulation des transporteurs secondaires de sucres phosphates, UhpT et GlpT, décrits

dans les deux sections précédentes. Sa régulation est principalement liée au système PTS (Reddy *et al.*, 1998). Ce système permet de détecter la présence de glucose à l'extérieur de la cellule. Il s'agit du premier sucre utilisé par les bactéries. En absence de glucose, il va activer une cascade de phosphorylation via plusieurs enzymes, dont EIIA. Celle-ci une fois phosphorylée, EIIA-P, peut activer l'adénylate cyclase et permettre la synthèse d'AMPc. Celui-ci doit se coupler avec la molécule CRP afin de pouvoir agir comme régulateur de l'expression génique. Ce système est décrit plus en détail dans la section 1.8.1.

L'AMPc est donc soumis à la répression catabolique en présence de glucose. La concentration d'AMPc dans la cellule est maintenue à 10^{-5} M. En cas d'utilisation d'un autre sucre que le glucose, sa concentration se situe autour de 2.4×10^{-4} M. Le complexe CRP-AMPc autorégule l'adénylate cyclase, en jouant le rôle de répresseur. Il permet le maintien de la concentration d'AMPc intracellulaire (Aiba *et al.*, 1985).

La synthèse d'AMPc est également activée au besoin, par le facteur d'élongation protéique EF-Tu, lors de la biosynthèse des protéines. Cette protéine est la plus abondante chez *E. coli*. Elle joue un rôle indispensable dans la synthèse protéique. Ef-Tu se lie aux ARNt (acide ribonucléique de transfert) lors de la synthèse protéique afin de permettre l'allongement des protéines (Reddy *et al.*, 1986)

1.8.5 MurA

Le gène *murA* est un gène conservé essentiel, codant pour l'enzyme UDP-N-acétyl glucosamine enolpyruvyl transférase (MurA). Elle catalyse, dans le périplasme, la première étape de synthèse des peptidoglycane de la paroi bactérienne. MurA transfère un groupement enol éther du phosphoénol pyruvate (PEP) à l'UDP-N-acétyl glucosamine (UDP-Glc-Nac), pour former l'acide N-acétyl muramique (UDP-Glc-Nac-EP) (Baum *et al.*, 2001) (Voir Figure 1.19)

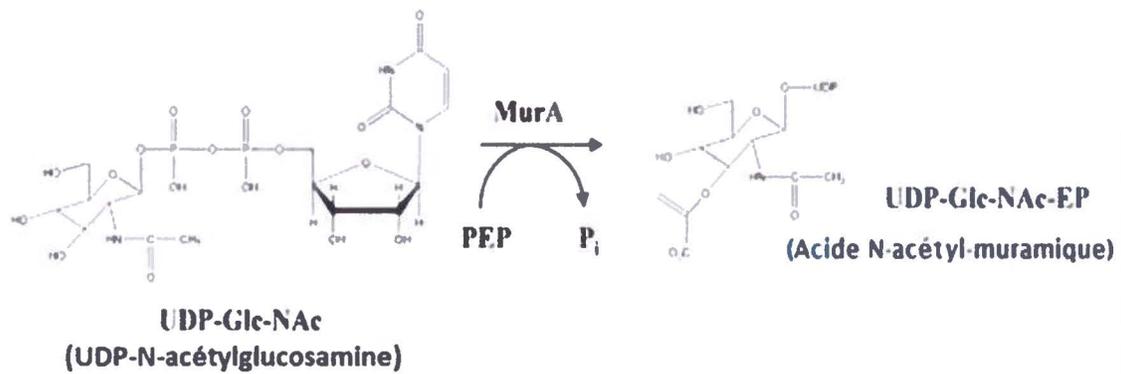


Figure 1.19 : 1^{ère} étape de la synthèse des peptidoglycans de la paroi cellulaire

MurA permet la synthèse d'UDP-Glc-Nac-EP en transférant un phosphate du phosphoenol pyruvate (PEP) à l'UDP-Glc-Nac (Modifié de El Zoeiby *et al.*, 2003)

Le gène *murA* se trouve sur le même opéron que le gène *ibaG*. À ce jour, les informations sur *ibaG* sont limitées. Ce serait un gène de réponse au stress acide. Il est un homologue de *bolA*, gène de réponse au stress acide et oxydatif, impliqué dans la morphogenèse et la croissance des cellules (Aldea *et al.*, 1989, Guinote *et al.*, 2012) (Voir Figure 1.20)



Figure 1.20 : Schéma de l'opéron *ibaG* et *murA*

Les peptidoglycanes sont des macromolécules indispensables, composantes de la paroi de pratiquement toutes les espèces de bactéries. La paroi bactérienne a pour fonction principale de maintenir l'intégrité cellulaire en procurant une certaine rigidité à la cellule, et de la protéger du stress osmotique. L'enzyme MurA participe au renouvellement de la paroi et est donc impliquée dans le processus de division cellulaire. En absence de cette protection, la bactérie ne peut plus faire face à la pression osmotique, le milieu cellulaire devient rapidement hypotonique, menant au gonflement puis à l'éclatement de la cellule. Donc une inactivation de *murA* entraîne la mort cellulaire (Nanninga, 1998, van Heijenoort, 2001). Comme expliqué précédemment, la fosfomycine se fixe au niveau d'une cystéine en position 115 (Cys115), et inhibe MurA. C'est le seul site de liaison connu pour la fosfomycine et le PEP (Schönbrunn *et al.*, 1996) (Voir Figure 1.21). Une étude a montré que la « sur-expression » de MurA procure une résistance à la fosfomycine. Cela permettrait la présence d'un plus grand nombre de molécules d'enzyme liées au PEP, donc actives, et le maintien de la synthèse de peptidoglycanes (Hori *et al.*, 1999).

L'importance du gène *murA* pour la viabilité des bactéries en fait une cible idéale pour le développement de nouveaux antibiotiques. Les recherches sur cette cible alternative ont pour but de contrer l'émergence de pathogènes résistants. Plusieurs études ont été faites dans ce sens, utilisant MurA comme cible pour le développement de nouveaux inhibiteurs bactériens (Baum *et al.*, 2001, El Zoeiby *et al.*, 2003).

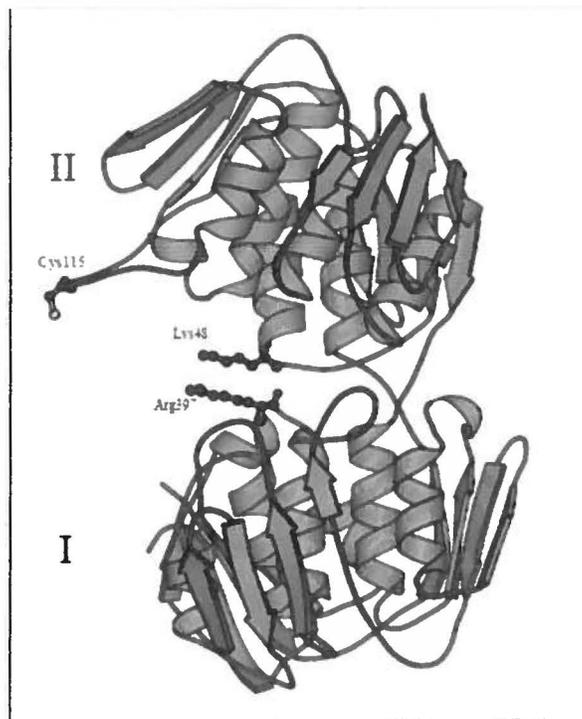


Figure 1.21 : Structure cristallisée de la protéine MurA

Structure de MurA stabilisée en position ouverte. MurA a deux sous-unités. Le résidu Cys115, site de liaison au substrat et à la fosfomycine se trouve sur la sous unités II. Les résidus Lys48 et Arg397 servent à la stabilisation de la protéine en formant un pont salin (Schönbrunn *et al.*, 1996).

Hypothèses et objectifs

Les études précédentes ont permis de déterminer les gènes dont les mutations sont responsables de la résistance à la fosfomycine (FO). Ils ont été séquencés et les systèmes dans lesquels ils sont impliqués sont bien documentés. Cependant les informations sur le « coût biologique » que ces mutations infligent aux UPEC restent incomplètes. Le but de notre étude est d'apporter des éléments de réponses qui permettraient de mieux comprendre les phénomènes sous-jacents à la différence entre la fréquence de génération de mutations spontanées observée lors des études *in vitro* et celle observée *in vivo*.

L'hypothèse prévoit que les mutations de résistance à la fosfomycine affectent le « coût biologique » des UPEC et diminuent leurs capacités à persister dans le tractus urinaire.

Les différents objectifs de ce mémoire sont de :

- Déterminer l'influence des mutations de résistance sur la production du fimbriae type 1 et la concentration minimale inhibitrice de FO
- Déterminer l'influence du milieu (urine humaine/milieu riche) sur la fréquence de génération spontanée de mutations de résistance à FO
- Séquencer les gènes potentiellement mutés chez les souches ayant subi une mutation spontanée.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

2.1 Souches d'*Escherichia coli* (*E. coli*) utilisées

Dans cette étude nous avons utilisé la souche K-12, MG1655, et les souches UPEC : CFT073, 536, ECOR72. Le Tableau 2.1 regroupe les différentes souches utilisées lors de ce projet, leur source, leur génotype ainsi que leur milieu de culture.

CFT073 fut la première souche UPEC à avoir été séquencée. Elle provient du sang d'une patiente souffrant de pyélonéphrite (infection des reins) de même que la souche 536 (Donnenberg, 2013). ECOR72 fait partie de la collection ECOR (*E. coli* référence collection) et a été isolé de l'urine d'une femme atteinte d'infection urinaire. Cette collection rassemble 72 types d'*E. coli* isolés d'hôtes humains et animaux. Elle a pour but de représenter la diversité génotypique et phénotypique des *E. coli* (Herzer *et al.*, 1990, Ochman *et al.*, 1984).

Les génomes de CFT073 et 536 ont été séquencés et comparés avec celui de la souche de laboratoire commensale K-12, MG1655, également utilisée dans cette étude (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006, Welch *et al.*, 2002). CFT073 et 536 sont porteurs de 432 gènes absents chez K-12, de plus la souche 536 possède 427 gènes absents chez toutes les autres souches d'*E. coli* recensées. La plupart de ces gènes sont retrouvés sur des îlots de pathogénicité codant pour des gènes de virulence, comme les fimbriae ou des toxines dont nous discuterons. Ils permettent aux UPEC de s'adapter au milieu particulier qu'est le tractus urinaire. Certaines souches peuvent appartenir à un même pathotype et porter des îlots de pathogénicité différents, comme c'est le cas pour CFT073 et 536 (Donnenberg, 2013, Dozois *et al.*, 1999).

Les souches ont été entreposées à -80 °C, avec l'antibiotique correspondant à leur résistance et 25 % de glycérol (v/v) dans le milieu spécifique à la croissance de chacune afin de conserver leurs mutations.

Tableau 2.1 : Souches d'*E. coli* utilisées

Souches	Génotype	Résistance*	Milieu de conservation	Sources ou références
MG1655	<i>F- lambda- ilvG- rfb-50 rph-1</i>		LB	(Blattner et al., 1997)
QT2667	MG1655 <i>ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2669	MG1655 <i>ΔglpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2903	MG1655 <i>ΔglpT::FRT ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2674	MG1655 <i>ΔptsT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2668	MG1655 <i>ΔcyaA::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT1733	MG1655 <i>ΔuhpT::FRT attTn7 ::uhpT</i>		LB	cette étude
MSLBMG ₁₉	MG1655 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSLBMG ₂₂	MG1655 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSLBMG ₂₃	MG1655 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSUrExMG ₁₁	MG1655 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSUrMG ₁₁	MG1655 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSUrMG ₁	MG1655 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
ECOR72	UPEC ; 72ème Souche de référence de la collection ECOR		LB	(Ochman et al., 1984)
QT2671	ECOR72 <i>ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2657	ECOR72 <i>ΔglpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2950	ECOR72 <i>ΔglpT::FRT ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2675	ECOR72 <i>ΔptsI::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2991	ECOR92 <i>ΔcyaA::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT1735	ECOR72 <i>ΔuhpT::FRT, att Tn7 ::uhpT</i>		LB	cette étude
MSLB72 ₂	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSLB72 ₅	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSLB72 ₁₈	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSG6P72 ₁	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	MH- G6P	cette étude
MSG6P72 ₅	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	MH-G6P	cette étude
MSUr72 ₅	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSUr72 ₁₂	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSUr72 ₁	ECOR72 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude

Souches	Génotype	Résistance*	Milieu de conservation	Sources ou références
536	UPEC (O6:K15:H31)		LB	(Hochhut et al., 2006)
QT2670	536 <i>ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2690	536 <i>ΔglpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2926	536 <i>ΔglpT::FRT ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2672	536 <i>ΔptsI::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2693	536 <i>ΔcyaA::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT1636	536 <i>ΔuhpT::FRT, att Tn7 ::uhpT</i>		LB	cette étude
MSLB536 ₁	536 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSLB536 ₁₆	536 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSLB536 ₂₁	536 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSMH536 ₁	536 mutant spontané	FO ^R	MH	cette étude
MSUr536 ₁	536 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
MSUr536 ₄	536 mutant spontané	FO ^R	Ur	cette étude
CFT073	UPEC (06 :H1:K2)		LB	(Mobley et al., 1990)
QT1921	CFT073 <i>ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT1922	CFT073 <i>ΔglpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2924	CFT073 <i>ΔglpT::FRT ΔuhpT::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT1924	CFT073 <i>ΔptsI::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT2692	CFT073 <i>ΔcyaA::FRT</i>	FO ^R	LB	cette étude
QT1734	CFT073 <i>ΔuhpT::FRT; attTn7::uhpT</i>		LB	cette étude
MSLB73 ₄	CFT073 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSLB73 ₉	CFT073 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSLB73 ₁₄	CFT073 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSUr73 ₂	CFT073 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
MSUr73 ₄	CFT073 mutant spontané	FO ^R	LB	cette étude
QT2361	<i>χ7279 Δfim ::FRT</i>		LB	(Crépin et al., 2012)
QT2359	CFT073 <i>fim</i> L-On		LB	(Crépin et al., 2012)
QT1081	CFT073 <i>ΔlacZYA</i>		LB	(Sabri et al., 2009)

Souches	Génotype	Résistance*	Milieu de conservation	Sources ou références
BW25142	<i>lacI^h rrnB3 ΔlacZ4787 hsdR514</i> DE(<i>araBAD</i>)567 DE(<i>rhaBAD</i>)568 Δ <i>phoBR580</i> <i>rph-1 galU95 ΔendA9</i> <i>uidA(ΔMlu)::pir-116 recA1</i> ; Souche de clonage		LB	(Haldimann <i>et al.</i> , 2001)
MGN617	<i>thi thr leu tonA lacY glnV supE</i> DΔ <i>asdA4 recA::RP4 2-Tc::Mu</i> [pir] ;	Km ^R	LB	(C M Dozois <i>et al.</i> , 2000)

LB : Luria- Bertani ; Ur : urine de femme ; MH : Mueller-Hinton ; MH-G6P : Mueller-Hinton supplémenté de 25 µg/ml glucose-6-phosphate ; Km^R : kanamycine résistant ; FO^R : fosfomycine résistant

2.2 Milieux de croissance et milieux sélectifs

Les cultures bactériennes ont été effectuées et conservées dans différents milieux : Luria-Bertani (LB) / urine de femme (Ur) / Mueller-Hinton (MH) ou Mueller-Hinton supplémenté de glucose-6-phosphate (MH-G6P). Ces milieux ont été utilisés liquides ou solides (supplémenté de 15 % d'agar) selon les besoins. Le milieu MH-G6P est supplémenté avec 25 µg/ml de G6P. Il est utilisé lors de tests de sensibilité à la fosfomycine sur gélose (Gupta *et al.*, 2011). Le milieu Ur liquide est constitué d'échantillons d'urine provenant de cinq femmes différentes âgées entre 24 et 33 ans, en bonne santé, et ne consommant aucun antibiotique. Il a été préalablement filtré à l'aide de filtres *Vacuum Filter* de la compagnie *Sarstedt* (Québec, Canada). Pour fabriquer 1L de géloses urines, nous avons autoclavé séparément 100 ml d'eau milli-Q contenant la quantité d'agar nécessaire pour une concentration finale de 15 %. On y a ajouté par la suite 900 ml d'urine filtrée, puis coulé le tout en géloses. Les milieux urines solides et liquides ont été conservés à 4 °C et utilisés dans un délai maximal de cinq jours.

Le milieu MacConkey a été utilisé pour tester l'utilisation du lactose et le milieu minimal M9 a été utilisé pour tester l'utilisation de plusieurs sucres. Ce dernier est composé de Na₂HPO₄ 0,04M, KH₂PO₄ 0,02M, NaCl 0,0085M, NH₄Cl 0,02M, MgSO₄•7H₂O 1M et CaCl₂ 0,01M. Il a

été complémenté avec différents sucres aux besoins, à hauteur de 0,2 % : glucose, glycérol-3-phosphate (G3P), G6P, mannose ou lactose.

Les antibiotiques dans leur concentration respective, ont été ajoutés lorsque nécessaire pour la sélection et le maintien des mutations et des plasmides : kanamycine (30 µg/ml), ampicilline (100 µg/ml), chloramphénicol (30 µg/ml) et gentamicine (50 µg/ml). La fosfomycine a été ajoutée dans des concentrations différentes variant selon les souches telles que : 536 (5 µl/ml), CFT073 (9 µl/ml), ECOR72 (6 µl/ml) et MG1655 (4 µl/ml). Pour certaines expériences, des concentrations de 500 µg/ml et 1000 µg/ml de fosfomycine ont été utilisées.

2.3 Transformation bactérienne et manipulation de l'ADN

Les transformations et la préparation des bactéries électrocompétentes et chimiocompétentes ont été réalisées selon le protocole de (Sambrook *et al.*, 2001). L'électroporation s'est faite à l'aide de la machine *Bio-Rad gene pulser* programmée à 1,8 KV (25 mF avec *Pulse controller* de 200 ohms). Ces appareils proviennent de la compagnie *Bio-Rad Inc* (Ontario, Canada). Les chocs thermiques ont été faits avec le bain-marie *MultiTempIII* de la compagnie *Amersham Bioscience* (Glattbrugg, Suisse). Les enzymes de restriction, ligases, polymérase et réactifs pour PCR, utilisés proviennent de la compagnie *Thermo Scientific* (Ottawa, Canada). Les fragments de PCR, les extractions plasmidiques et produits digérés ont été extraits et purifiés avec les trousse de biologie moléculaire provenant de la compagnie *Bio Basic Canada Inc* (Ontario, Canada). L'ADN a été dosé avec le spectrophotomètre *NanoDrop ND-1000* (*NanoDrop Technologies*, Wilmington, DE). La densité optique (D.O.) a été déterminée à l'aide du spectrophotomètre *Genesys20* de la compagnie *Thermo Scientific* (Ottawa, Canada).

2.4 PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)

La PCR a été appliquée afin d'amplifier les gènes d'intérêt pour la construction des mutants, les complémentations, les séquençages et la confirmation des génotypes. Les ADN polymérases utilisées sont la Taq polymérase et la Taq+ polymérase, quand une plus grande précision était de mise. Les réactions ont été réalisées dans un appareil *Master Gradient* (Eppendorf). Les conditions des PCR ont été effectuées selon le protocole du fournisseur des ADN polymérases, pour des réactions de 30 cycles. Les désoxyribonucléotides (dNTPs) ont été utilisés à une concentration de 0.1 mM. Pour l'usage de la Taq polymérase, une phase de dénaturation de 20 secondes à 95 °C, puis un temps d'hybridation de 40 secondes entre 55 et 60 °C ont été effectués selon les amorces utilisées. Pour la Taq+ polymérase, les températures utilisées étaient les mêmes, excepté le temps de dénaturation qui a été de 30 secondes et celui d'hybridation a été de 1 minute 30 secondes. Pour les deux amorces, la phase d'élongation suivante a été effectuée à 72 °C, avec une durée dépendante du fragment d'ADN à amplifier. La purification des fragments PCR a été réalisée en suivant le protocole du fournisseur. Pour vérifier l'amplification des fragments, 5 µl d'échantillon ont été déposés sur gel contenant 1 % d'agarose et 0,5 µg/ml de concentration finale de bromure d'éthidium (EtBR) dans le gel. Le marqueur d'ADN *Gene Ruler* de la compagnie *Thermo Scientific* (Ottawa, Canada) a permis de déterminer la taille des fragments. Puis leur concentration a été déterminée à l'aide du *Nanodrop*. Les amorces utilisées ont été synthétisées par la compagnie *Integrated DNA Technology* (IDT), et sont présentées dans le Tableau 2.2 suivant :

Tableau 2.2 : Liste des amorces utilisées

Nom de l'amorce	Gène visé/ orientation de l'amorce	Séquence 5'-3'	Utilisation*
CMD1051	<i>uhpT</i> /sens	TTT TTA CAA TGC ATG CCT CAC GCA GGT ATT CAT TTC AGG AGT AAC CCA TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G	Amplification cassette <i>kan</i> avec homologie du gène <i>uhpT</i>
CMD1052	<i>uhpT</i> /sens	GTC ATG CCG GGC AAA AGT CAC CAG TTA CGT TTA TGC CAC TGT CAA CTG CTA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C	
CMD1053	<i>uhpT</i> /sens	TCG ATA CCT GGC ACT GGA G	Vérification des délétions
CMD1054	<i>uhpT</i> /sens	CTG GCG GTC AAT CAG GTG	<i>uhpT::kan</i> et <i>uhpT::FRT</i>
CMD1055	<i>glpT</i> /sens	ATC AGG CTG TTA ATC ATA AAT AAG ACC ACG GGC CAC GGA GGC TAT CAA TGA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C	Amplification cassette <i>kan</i> avec homologie du gène <i>glpT</i>
CMD1056	<i>glpT</i> /antisens	TTA GCC TCC GTT GCG TTC TTG CAG TAA TTG TTC ATG GCG ACG TTT TTC GCT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G	
CMD1057	<i>glpT</i> /sens	CGA GTC GCG AGT TTT CAT TG	Vérification des délétions <i>glpT::kan</i>
CMD1058	<i>glpT</i> /antisens	ATT GCA CTG CTT CCC ATG AC	et <i>glpT::FRT</i>
CMD1063	<i>ptsI</i> /sens	TAA TTT CCC GGG TTC TTT TAA AAA TCA GTC ACA AGT AAG GTA GGG TTA TGA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C	Amplification cassette <i>kan</i> avec homologie du gène <i>ptsI</i>
CMD1064	<i>ptsI</i> /antisens	AAG CAG TAA ATT GGG CCG CAT CTC GTG GAT TAG CAG ATT GTT TTT TCT TCT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G	
CMD1065	<i>ptsI</i> /sens	GTG ACT TCC AAC GGC AAA AG	Vérification des délétions <i>ptsI::kan</i>
CMD1066	<i>ptsI</i> /antisens	TTC CGG TAT CCT TCT TGT CG	et <i>ptsI::FRT</i>
CMD1354	<i>cyaA</i> /Sens	GTT GGC GGA ATC ACA GTC ATG ACG GGT AGC AAA TCA GGC GAT ACG TCT TGA TTC CGG GGA TCC GTC GAC C	Amplification cassette <i>kan</i> avec homologie du gène <i>cyaA</i>
CMD1355	<i>cyaA</i> /antisens	AAC GGA ATC ACC TGT TCA CGA CCA TCA ACC TTC ACA ATC TGA TAG AAC TGT GTA GGC TGG AGC TGC TTC G	
CMD1356	<i>cyaA</i> /Sens	CTT TAC GGT CAA TCA GCA AGG	Vérification des délétions
CMD1357	<i>cyaA</i> /antisens	ACC AGG TAT GGC TGG CAA C	<i>cyaA::kan</i> et <i>cyaA::FRT</i>
CMD1710	<i>glpT</i> /sens	CCGCCAATGCCCGGACGTCACCTTGATTGCGAGTC	
CMD1709	<i>glpT</i> / antisens	TAGCGCCACCTCGAGCGTATGCTCCGGCAAATATC	Séquencage du gène <i>glpT</i>
CMD1712	<i>glpT</i> /sens	CAGTCGAGGATGCCGTAAC	
CMD1711	<i>glpT</i> / antisens	CTGGTGGTCGCAGAAAGAAC	

Nom de l'amorce	Gène visé/ orientation de l'amorce	Séquence 5'-3'	Utilisation*
CMD1714	<i>cyaA</i> /sens	GT'ACCCGGGTT'ATCATCCGIGG'FCCA'CC	Séquençage du gène <i>cyaA</i>
CMD1713	<i>cyaA</i> /antisens	AGCGGCTCGAGCTTCTGGGATTTGCTGGAAC	
CMD1716	<i>cyaA</i> /sens	GCACCAAAGTACTCTTCAGCAG	
CMD1715	<i>cyaA</i> /antisens	TTCTCGCCAAAGCTGAAGAC	
CMD1718	<i>cyaA</i> /sens	GCCGGTAAGCGTATTCTGTG	
CMD1717	<i>cyaA</i> / antisens	GACACCGAAGGCGCTCTA	
CMD1722	<i>ptsI</i> /sens	CGT'AT'GAGCTCACCGCA'T'GTTTGCCGAT'CTC	Séquençage du gène <i>ptsI</i>
CMD1721	<i>ptsI</i> / antisens	GTTCTAGGCCTCCTTCTTGTCGTCGGAAAC	
CMD1724	<i>ptsI</i> /sens	TCGCTTTCGGTAAAGCTCTG	
CMD1723	<i>ptsI</i> / antisens	ACCAGCTTTCGTTTTGATCG	
CMD1726	<i>ptsI</i> /sens	GTTGAAGGTGCAGAGCGTAA	Séquençage du gène <i>ptsI</i>
CMD1725	<i>ptsI</i> / antisens	GCAGCAAAGTGTCTTCTTCAG	
CMD1727	<i>murA</i> /sens	TCAGGGGGTAAACGACAAAG	Séquençage du gène <i>murA</i>
CMD1728	<i>murA</i> /antisens	TGATGCGTAGCTACACTAAACC	
CMD1729	<i>murA</i> /sens	TGCTGCTCTGCCTATCCTT	
CMD1730	<i>murA</i> /antisens	TGCATATCGGICGGGAAT	
CMD1706	<i>uhpT</i> /sens	GATGCATCTCCCGGGTCACTTCATATCCGGCAAAC CCCGGG = site de restriction XmaI	Complémentation et séquençage du gène <i>uhpT</i>
CMD1705	<i>uhpT</i> / antisens	GTCTCTTCCICGAGATCCCGCGCTAAAATAAC CTCGAG = site de restriction XhoI	
CMD1707	<i>uhpT</i> / sens	TACTGGCA'GT'GATACACACCGAGC	Séquençage du gène <i>uhpT</i>
CMD1708	<i>uhpT</i> / antisens	AGCCTGTTCCTGATGATTGCCTTC	
CMD1073	<i>pstT</i> _Tn7/antisens	AGATCAGTTTGGGTACGCCAGGT	Vérification de l'intégration chromosomique de <i>uhpT</i> au site <i>attTn7</i>

*Kan= Kanamycine ; FRT = séquences FRT

2.5 Mutagénèse

Les mutants réalisés dans le cadre de ce projet ont été élaborés avec la technique mise au point par Datsenko et Wanner (Datsenko *et al.*, 2000). Cette technique permet de remplacer un gène au sein du chromosome bactérien, par un gène homologue codant pour une cassette de résistance à un antibiotique. Elle utilise les propriétés du système λ red recombinaise, mis sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Il se trouve sur le plasmide pKD46 (voir Tableau 2.2). Le système λ red recombinaise code pour les gènes γ , β , et *exo*. Le gène γ code pour la protéine Gam qui inhibe l'exonucléase V RecBCD de la bactérie, rendant l'ADN chromosomique accessible. Cela permet aux produits des gènes β et *exo* d'accéder à l'ADN bactérien afin de produire la recombinaison de l'allèle portant la cassette de résistance avec le gène à déléter. La cassette de résistance dépend du plasmide utilisé pour sa synthèse : les plasmides pKD13 et pKD4 portent le gène de résistance à la kanamycine (Km^R) et pKD3 porte le gène de résistance au chloramphénicol (Cm^R). Les amorces utilisées ont un fragment 3' qui s'apparie à une séquence d'homologie se trouvant de part et d'autre du gène à muter. Puis grâce à la recombinaise FLP présente sur le plasmide pCP20 (voir Tableau 2.2), la cassette de résistance peut être enlevée si désiré. Elle reconnaît les séquences FRT de part et d'autre de la cassette, et peut ainsi l'exciser.

Les étapes de cette technique décrites de façon succincte sont les suivantes : les souches à muter sont transformées avec le plasmide pKD46 thermosensible. Puis elles sont mises en agitation à 30 °C en présence d'ampicilline, afin de maintenir le plasmide, et de L-arabinose, afin d'induire l'expression des gènes du système λ red recombinaise. Les souches sont transformées par l'électroporation avec l'allèle à recombinaison, portant le gène de résistance à la kanamycine. Elles sont mises en culture sur gélose LB à 37 °C avec kanamycine afin de perdre le plasmide thermosensible pKD46 et de sélectionner les clones mutés porteurs de la cassette kanamycine. Puis le plasmide pCP20 est introduit par électroporation dans les mutants sélectionnés. Il permet ainsi l'excision de la cassette de résistance.

Les mutants de cette étude ont été obtenus à partir des souches sauvages citées dans le Tableau 2.1 et des amorces citées dans le Tableau 2.2. Le plasmide pKD13 a été utilisé pour la construction des allèles portant la cassette de résistance à la kanamycine (Tableau 2.2).

La construction des mutants aux génotypes ($\Delta uhpT :: FRT$) et ($\Delta glpT :: FRT$) dérivés des souches sauvages CFT073, 536, ECOR72 et MG1655, a été faite respectivement avec les ensembles d'amorces CMD1051-1054 et CMD1055-1758. Les gènes *uhpT* et *glpT* sont des gènes conservés, alors l'homologie des amorces avec les quatre souches a été vérifiée avec le site de vérification d'homologie de séquence : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.

Pour la construction des doubles mutants au génotype ($\Delta uhpT :: FRT ; \Delta glpT :: FRT$) dérivés de ces mêmes souches sauvages, les mêmes ensembles d'amorces CMD1055-1758 et CMD1051-1054 ont été employés.

Ainsi, de la même façon et à partir de ces mêmes souches sauvages, la construction des mutants ($\Delta ptsI :: FRT$) et ($\Delta cyoA :: FRT$) a été effectuée respectivement avec les ensembles d'amorces CMD1063-1066 et CMD1354-1356.

2.6 Complémentation

La complémentation des mutants ECOR72 ($\Delta uhpT :: FRT$), CFT073 ($\Delta uhpT :: FRT$), 536 ($\Delta uhpT :: FRT$) et MG1655 ($\Delta uhpT :: FRT$) a été faite selon un protocole de notre laboratoire (Crépin *et al.*, 2012a). Cette méthode permet l'intégration simple copie de l'allèle du gène à compléter, au niveau de site *attTn7* entouré des gènes *glmS* et *pstS* chez les entérobactéries.

La séquence du gène *uhpT* incluant le promoteur a été amplifiée de la souche sauvage MG1655, avec les amorces CMD1731 et CMD1732 ayant respectivement les sites de restriction *XmaI* et *XhoI* (voir Tableau 2.2). L'homologie des séquences a été vérifiée avec le site de vérification d'homologie de séquence : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Les amplicons ont ensuite été digérés avec les enzymes de restriction respectives. De même, le plasmide pIJ253 (*AmpR* et *GmR*) a été digéré par les mêmes enzymes aux sites de restriction respectifs, qui se situent entre les bras *Tn7*. Ils ont pu être ligués avec l'ADN T4-ligase, selon le protocole du fournisseur *Thermo Scientific* (Ottawa, Canada). Le gène *uhpT* a été intégré entre les deux bras *Tn7* du plasmide pIJ253 et forme le plasmide pIJ457 (voir Tableau 2.2). Les produits de ligation sont transformés par choc thermique dans la souche de clonage BW25142 afin d'être amplifiés (voir Tableau 2.1). Puis ils ont été étalés sur gélose LB avec ampicilline et gentamicine pour

sélectionner les clones transformés. Le plasmide a pu être extrait et l'intégration du gène dans ce plasmide a été vérifiée par PCR avec les amorces CMD1707 et CMD1708 (voir Tableau 2.2). Le plasmide pIJ457 est ensuite transformé par choc thermique dans la souche de conjugaison *E. coli* MGN617. La croissance de cette souche est dépendante de la présence d'acide diaminopimélique (DAP). Les clones transformés sont donc sélectionnés sur gélose LB avec ampicilline, gentamicine et DAP.

Les souches mutées ECOR72 ($\Delta uhpT :: FRT$), CFT073 ($\Delta uhpT :: FRT$), 536 ($\Delta uhpT :: FRT$) et MG1655 ($\Delta uhpT :: FRT$), ont été transformées par électroporation avec le plasmide thermosensible pIJ258 portant les gènes des transposases (*tnsABCD*). Le plasmide pIJ457 est transféré par conjugaison dans les souches à compléter portant le plasmide pIJ258, 18 heures à 30 °C sur gélose LB supplémentée de DAP et de kanamycine. Cela permet de conserver la souche MHN617 et les plasmides pIJ258 et pIJ253. Les transformants sont ensuite étalés sur gélose LB avec gentamicine sans DAP, afin d'éliminer la souche MGN617. La sensibilité à l'ampicilline des transformants sélectionnés est également vérifiée. Cela suggère la perte du plasmide pIJ253 lors de la transposition des allèles au site *attTn7* des souches à compléter, grâce aux transposases codées par le plasmide pIJ258. L'intégration chromosomique du gène *uhpT* est vérifiée grâce aux amorces CMD1073 ayant une homologie pour le gène *pstS* bordant le site *attTn7* chromosomique et l'amorce CMD1731 ayant une homologie pour *uhpT* (voir Tableau 2.2). La correspondance de l'amorce CMD1073 pour les quatre souches ECOR72, CFT073, 536 et MG1655 a également été vérifiée grâce au site de vérification d'homologie de séquence. Les clones complétés obtenus sont : QT1733 (MG1655 $\Delta uhpT :: FRT$ *attTn7 :: uhpT*), QT1735 (ECOR72 $\Delta uhpT :: FRT$, *attTn7 :: uhpT*), QT1636 (536 $\Delta uhpT :: FRT$, *att Tn7 :: uhpT*), QT1734 CFT073 $\Delta uhpT :: FRT$; *attTn7:: uhpT*) (voir Tableau 2.1).

Tableau 2.2 : Plasmides utilisés

Plasmides	Génotype	Résistance*	Source/Référence
pIJ258	pST6K :: <i>tns</i> ABCD	Cm ^R	(Crépin <i>et al.</i> , 2012a)
pIJ253	pGP704 :: Tn7T-Gen ;	Amp ^R , Gm ^R	(Crépin <i>et al.</i> , 2012a)
pCP20	Porte les gènes de la recombinaise Flp ; Thermosensible ;	Amp ^R ; Cm ^R	(Datsenko <i>et al.</i> , 2000)
pKD13	Matrice pour l'amplification de la cassette de résistance <i>kan</i> , flanquée de sites FRT	Kan ^R	(Datsenko <i>et al.</i> , 2000)
pKD46	Porte les gènes pour la λ Red recombinaise ; Thermosensible ;	Amp ^R	(Datsenko <i>et al.</i> , 2000)
pIJ457	pIJ253 :: <i>uhpT</i>	Amp ^R , Gm ^R	cette étude

*Cm^R = Chloramphénicol résistant, Amp^R = Ampicilline résistant,
Gm^R = Gentamicine résistant, Kan^R = Kanamycine résistant

2.7 Courbes de croissance

La capacité à croître dans l'urine et dans le milieu LB des souches sauvages CFT073, 536, ECOR72 et MG1655, des simples mutants ($\Delta uhpT :: FRT$), ($\Delta glpT :: FRT$) et des doubles mutants ($\Delta uhpT :: FRT ; \Delta glpT :: FRT$) qui en dérivent, a été comparée. Des précultures des souches et mutants à tester ont été faites au préalable (incubation 18 heures à 37 °C avec agitation). Puis une culture diluée 1 :100 à partir de chaque préculture (50 μ l dans 5 ml) a été mise en incubation à 37 °C avec agitation pour 3 heures. À partir de ces dernières, 4 réplicats de 200 μ l ont été effectués pour chaque échantillon, dans une plaque de 100 puits mise en agitation à 37 °C. L'incubation des échantillons et la lecture des densités optiques (D.O.) ont été réalisées avec l'appareil *BioscreenC* (*Growth Curve*, USA), programmé pour une lecture de D.O. à 600 nm toutes les 15 minutes, pendant 24 heures.

2.8 Agglutination sur levure

Le test d'agglutination sur levure est dérivé du test de micro-agglutination sur plaque 96 puits à fond rond (Provence *et al.*, 1992). Le test a été fait avec les souches sauvages CFT073, 536, ECOR72 et MG1655, les simples mutants - ($\Delta uhpT :: FRT$) ($\Delta glpT :: FRT$) ($\Delta ptsI :: FRT$) ($\Delta cyaA :: FRT$) - et les doubles mutants ($\Delta uhpT :: FRT ; \Delta glpT :: FRT$) qui en dérivent (Tableau 2.1). Des précultures en LB ont été préparées au préalable (18 h, à 37 °C avec agitation en LB). Puis elles ont étéensemencées dans 20 ml (dilution 1 :10) de LB à 37 °C avec agitation, jusqu'au milieu de la phase de croissance, soit une D.O. de 0,6 à 600 nm. Les cellules ont ensuite été centrifugées et les culots resuspendus dans une solution PBS (*Phosphate Buffered Saline*) à pH 7,4 pour une concentration finale de 2×10^{11} cellules/ml. Les échantillons ont ensuite été dilués en série deux fois dans les puits de microtitration. Un volume égal d'une suspension de levures sèches actives commerciales (compagnie *Fleischmann's*, Ontario, Canada) de 3 % a été ajouté à chacun des puits. L'agrégation des bactéries aux levures a été contrôlée visuellement, après 30 min d'incubation sur la glace. Le titre d'agglutination est enregistré comme étant le puit de l'échantillon le plus dilué qui donne une réaction d'agrégation positive. La dilution effectuée correspond au carré du titre d'agglutination. Par exemple, un titre d'agglutination de 4 correspond à une dilution de 16 fois. La souche QT2359 (*fim locked ON*) a été utilisée comme contrôle positif et la souche QT2361 (mutant Δfim) comme contrôle négatif (voir Tableau 2.1.). Les tests ont été faits en duplicata.

2.9 Coinfection de tractus urinaire de souris

Le modèle d'infection utilisé lors de cette étude est adapté de Hagberg et son équipe (Hagberg *et al.*, 1983). Les souches utilisées pour les coinfections sont QT1081 (CFT073 $\Delta lacZYA$), qui est une souche lac- (souche parentale virulente) et le mutant QT2914 (CFT073 $\Delta glpT :: FRT$ $\Delta uhpT :: FRT$). L'utilisation de la souche lac- au phénotype sauvage, QT1081, permet de la différencier de la souche mutée qui demeure lac+ et contre laquelle elle est mise en compétition (voir Tableau 2.1). Des tests *in vivo* avec $\Delta ptsI$ (Kok *et al.*, 2003) et $\Delta cyaA$ (Curtiss *et al.*, 1987) ont déjà été pratiqués chez *Salmonella*. Nous avons donc privilégié un test de coinfection de souris avec un mutant $\Delta glpT \Delta uhpT$ afin de tester l'effet de la délétion des deux transporteurs de

sucre phosphate (UhpT et GlpT) sur la capacité d'infecter, en présence de la souche sauvage. Ainsi, nous avons préférentiellement choisi le mutant QT2914, car notre laboratoire possède déjà la souche parentale lac-, QT1081. Les souris utilisées sont des femelles CBA/J âgées de 6 à 7 semaines, provenant de la compagnie *The Jackson Laboratory* (Maine, USA).

Préparation de l'inoculum

Toutes les souches utilisées pour les infections proviennent directement des stocks glycérols. Des colonies ont été préalablement isolées sur gélose LB la veille, à 37 °C pendant 16 heures. Puis une colonie a été préalablement inoculée dans 5 mL de LB à 37 °C en agitation pendant 6 heures. Par la suite, 550 µL de cette préculture a servi à inoculer 55 mL de LB, incubés à 37 °C pendant 16 heures, en agitation. Un échantillon de chaque mélange est conservé, afin de déterminer la concentration bactérienne pour chaque souche. Puis les D.O. à 600 nm des cultures sont vérifiées avant qu'elles ne soient mélangées ensemble et concentrées. Cela permet de confirmer que le culot est uniforme, c'est-à-dire à parts égales des deux souches à tester en coinfection. Le culot est resuspendu dans la goutte restante. Les mélanges sont maintenus sur glace jusqu'à l'infection des souris.

Infection des souris et dénombrement bactérien

Dix souris CBA/J, pour chaque paire de bactéries à tester en coinfection, ont été utilisées. Elles ont été anesthésiées par inhalation d'isoflurane dans une chambre à gaz. Puis 20 µl de l'inoculum ($\approx 10^9$ bactéries) ont été inoculés par cathéter directement dans la vessie via l'urètre. Les souris sont sacrifiées 48 h après infection, en étant auparavant anesthésiées par inhalation d'isoflurane puis euthanasiées par inhalation de CO₂ en chambre à gaz. La vessie et les reins sont récupérés et pesés. Ils sont ensuite broyés et homogénéisés dans un volume de tampon BSG - (1.5 M NaCl, 20 mM KH₂PO₄, 50 mM Na₂HPO₄ (pH 7,7), 0,1 % (p/v) gélatine) – équivalant à quatre fois le poids de l'organe pour une dilution finale 1 :5. Les homogénats sont encore dilués en série dans du BSG, avant d'être étalés sur des géloses MacConkey. Cela permet d'obtenir une quantité de colonies dénombrables, afin de déterminer le nombre d'unités formatrices de colonie (UFC) par gramme de tissu. Après 18 h de croissance à 30 °C, un décompte bactérien peut être effectué pour déterminer le nombre de colonies lac- et lac+, c'est-à-dire le nombre de souches sauvages et

de mutants. Ainsi le nombre d'UFC peut être déterminé pour chaque souche, dans chaque organe.

2.10 Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) et du profil phénotypique

Les CMI des souches sauvages CFT073, 536, ECOR72 et MG1655, des simples ($\Delta uhpT :: FRT$), ($\Delta glpT :: FRT$) et doubles mutants ($\Delta uhpT :: FRT ; \Delta glpT :: FRT$) ont été déterminées sur milieu MH selon les directives du CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI, 2012). Nous avons utilisé des bandes de fosfomycine avec gradient de diffusion (*E-Strip*), provenant de la compagnie *Biomérieux* (Lyon, France). Les bandes ont aussi été utilisées sur géloses urines afin de comparer les résultats. Pour ce faire, 100 μ l/ml de culture bactérienne mise en incubation en LB, 16 à 18 heures avec agitation, ont été étalés sur les géloses. La bande a ensuite été déposée au centre et le tout mis en incubation pendant 18 à 20 heures à 37 °C. La CMI est la plus petite concentration lisible sur la bandelette ayant permis l'inhibition de la croissance bactérienne.

Le profil phénotypique de ces mêmes souches et mutants a été déterminé en observant leur capacité de croissance sur MacConkey et en milieu minimal M9 en présence de glucose, G6P, G3P, mannose ou lactose. On a ainsi obtenu un profil des capacités de croissance en présence de différentes sources de carbone, spécifique à chaque souche sauvage et à chaque mutant spécifique.

2.11 Détermination de la fréquence de génération de mutants spontanés résistants à la fosfomycine

La fréquence de génération de mutation spontanée (FM) de résistance à la fosfomycine a été déterminée, selon le ratio suivant (Rosche *et al.*, 2000):

$$FM = \frac{\text{La quantité de bactéries ayant survécue après incubation en présence de fosfomycine}}{\text{La quantité totale de bactéries initialement inoculées}}$$

La FM a été déterminée pour les souches sauvages CFT073, 536, ECOR72 et MG1655 (voir Tableau 2.1). Différents milieux solides (MH, MH-G6P, LB, et Ur en géloses) ont été utilisés afin de déterminer et de comparer les fréquences durant différentes phases de croissance des bactéries. L'antibiotique, la fosfomycine, a été ajouté dans ces milieux pour une concentration finale équivalente à 10 fois celle de la CMI déterminée pour chaque souche sauvage : CFT073 (9 µg/ml), MG1655 (4 µg/ml), 536 et ECOR72 (5,5 µg/ml). Ainsi, chaque souche a été inoculée sur des géloses contenant une concentration de fosfomycine qui leur était spécifique. Pour déterminer la FM en phase stationnaire, des cultures de 16 à 18 heures d'incubation, à 37 °C en LB avec agitation, ont été utilisées. Pour déterminer la FM en milieu de phase de croissance, les cultures de 16 à 18 heures ont été diluées 1 : 10 dans 20 ml de LB, puis mis en incubation à 37 °C avec agitation. Celles-ci ont ensuite été utilisées une fois le milieu de la phase de croissance atteinte, soit après 3 à 4 heures d'incubation (D.O₆₀₀ 0,6). Lors de l'inoculation, afin de pouvoir dénombrer le nombre d'UFC, des dilutions en série dans du PBS (1 : 10) ont été effectuées, et 100 µl de chaque dilution ont été inoculés sur les géloses avec et sans antibiotique. Les géloses ont été mises en incubation à 37 °C pendant 18 à 20 heures. Après incubation, un dénombrement cellulaire a été fait pour chaque inoculum sur géloses sans antibiotique, afin de déterminer la quantité totale de bactéries initialement inoculée. Un second dénombrement a été fait sur géloses avec antibiotique, afin de déterminer la quantité de bactéries ayant survécues à la présence de la fosfomycine après l'incubation. Ces deux comptes ont été utilisés dans l'équation pour le calcul de la FM. Les tests ont été réalisés en triplicata. Chaque réplicat a été fait avec le même lot de gélose d'urine afin d'éviter les biais dus aux variations dans la composition de l'urine.

2.12 Sélection, séquençage et analyses du génome des mutants spontanés résistants à la fosfomycine.

Lors de la détermination de la FM, entre 20 et 24 mutants spontanés résistants à la fosfomycine ont été sélectionnés pour chaque souche sauvage testée (CFT073, 536, ECOR72 et MG1655) en phase exponentielle et en phase stationnaire de croissance; et ce pour les milieux riches MH, MH-G6P, LB. De la même façon, entre 8 et 10 mutants spontanés résistants à la fosfomycine ont été sélectionnés en urine, pour chacune des souches sauvages, car il y en avait moins. Ils sont conservés dans un milieu identique à leur milieu de sélection avec 25 % de glycérol (v/v) à -80 °C.

Le profil phénotypique de chacun des mutants spontanés sélectionnés a été déterminé de la même façon que pour les souches sauvages (voir section 2.10.). Cela a permis de déterminer quel système est possiblement touché par une mutation de résistance à la fosfomycine. Deux ou trois mutants spontanés de chacune des souches ont été sélectionnés, afin de faire séquencer les gènes possiblement mutés. Les gènes ciblés étant des gènes conservés, un ensemble d'amorces pour un même gène a été utilisés pour les différentes souches. Les ensembles d'amorces CMD1705-1708 ont été employés pour séquencer le gène *uhpT*. L'ensemble d'amorces CMD1709-1712 a été utilisé pour séquencer le gène *glpT*. Le gène *ptsI* a été séquencé avec l'ensemble d'amorces CMD1721-1726, *cyaA* a été séquencé avec l'ensemble CMD1713-1718 et *murA* a été séquencé avec l'ensemble CMD1727- 1730 (voir Tableau 2.2). Les échantillons ont été envoyés au *Service de Séquençage du Centre Innovation Génome Québec* à l'Université McGill (Montréal, Québec). L'analyse des séquences a été faite avec les logiciels *BioEdit (Ibis Bioscience Software)* et *Clone Manager (Scientific & Educational Software)*. Les mutants spontanés dont les gènes ont été séquencés sont listés dans les Tableau 2.1

2.13 Graphiques et tests statistiques

Les courbes et graphiques présentés et les tests statistiques utilisés au cours de cette étude ont été réalisés avec le logiciel *Prism4 (GraphPad Software)*.

Chapitre 3 : Résultats

3.1 Courbe de croissance

Nous avons utilisé trois souches uropathogènes CFT073, ECOR72, 536 et une souche de laboratoire K-12, MG1655. Les gènes connus pour procurer une résistance à l'antibiotique fosfomycine ont été inactivés chez ces souches lors de la création des mutants dirigés. Ces mutations concernent la délétion des gènes *uhpT*, *glpT*, *ptsI* et *cyaA*. Leur effet sur la croissance des souches UPEC utilisées pour cette étude a été testé en milieu riche Luria-bertani (LB) (voir Figure 3.1) et en urine humaine (voir Figure 3.2). L'urine humaine est utilisée pour se rapprocher du milieu de croissance que rencontrent les UPEC dans le tractus urinaire.

Les souches sauvages et les mutants ont une courbe de croissance similaire en LB. Ils atteignent la phase stationnaire environ 8 heures après incubation pour 536, ECOR72 et leurs mutants (D.O._{600nm} après 8 heures $\approx 1,4$). Les souches MG1655, CFT073 et leurs mutants atteignent la phase stationnaire plus vite, environ 6 heures après incubation (D.O._{600nm} après 6 heures $\approx 1,4$). Les mutations ne modifient pas la capacité des souches à croître en LB par rapport aux souches sauvages (voir Figure 3.1).

Les souches et leurs mutants atteignent la phase stationnaire après environ 5 heures de croissance en urine (voir Figure 3.2). Les mutants $\Delta cyaA$ font exception. Ils présentent un retard de croissance et atteignent la phase stationnaire après 15 heures d'incubation pour MG1655, CFT073 et 536. Les mutations touchant à la fois les deux transporteurs ($\Delta uhpT$, $\Delta glpT$), celles touchant le transporteur UhpT ($\Delta uhpT$) et celles touchant la synthèse d'AMPc ($\Delta cyaA$) réduisent la croissance des mutants ECOR72. Pour la souche CFT073, c'est le mutant ne pouvant pas synthétiser les transporteurs de sucre alternatif ($\Delta ptsI$) qui a une croissance ralentie par rapport aux autres souches. Pour MG1655, tous les mutants atteignent une D.O. en phase exponentielle inférieure à celle de la souche sauvage. Cette dernière semble avoir de meilleures capacités à croître en urine que les mutants. La souche sauvage 536 et ses mutants présentent une croissance similaire à l'exception du mutant $\Delta cyaA$ cité au préalable.

De façon générale, on peut observer que la croissance en urine des souches sauvages et des mutants est plus lente, en comparaison avec leur croissance en LB. Ils atteignent la phase stationnaire à une D.O. beaucoup plus basse en urine (D.O._{600nm} $\approx 0,45$ en urine, contre D.O._{600nm}

≈ 1,4 en LB). On peut également constater que les effets sont différents selon les mutations et selon les souches.

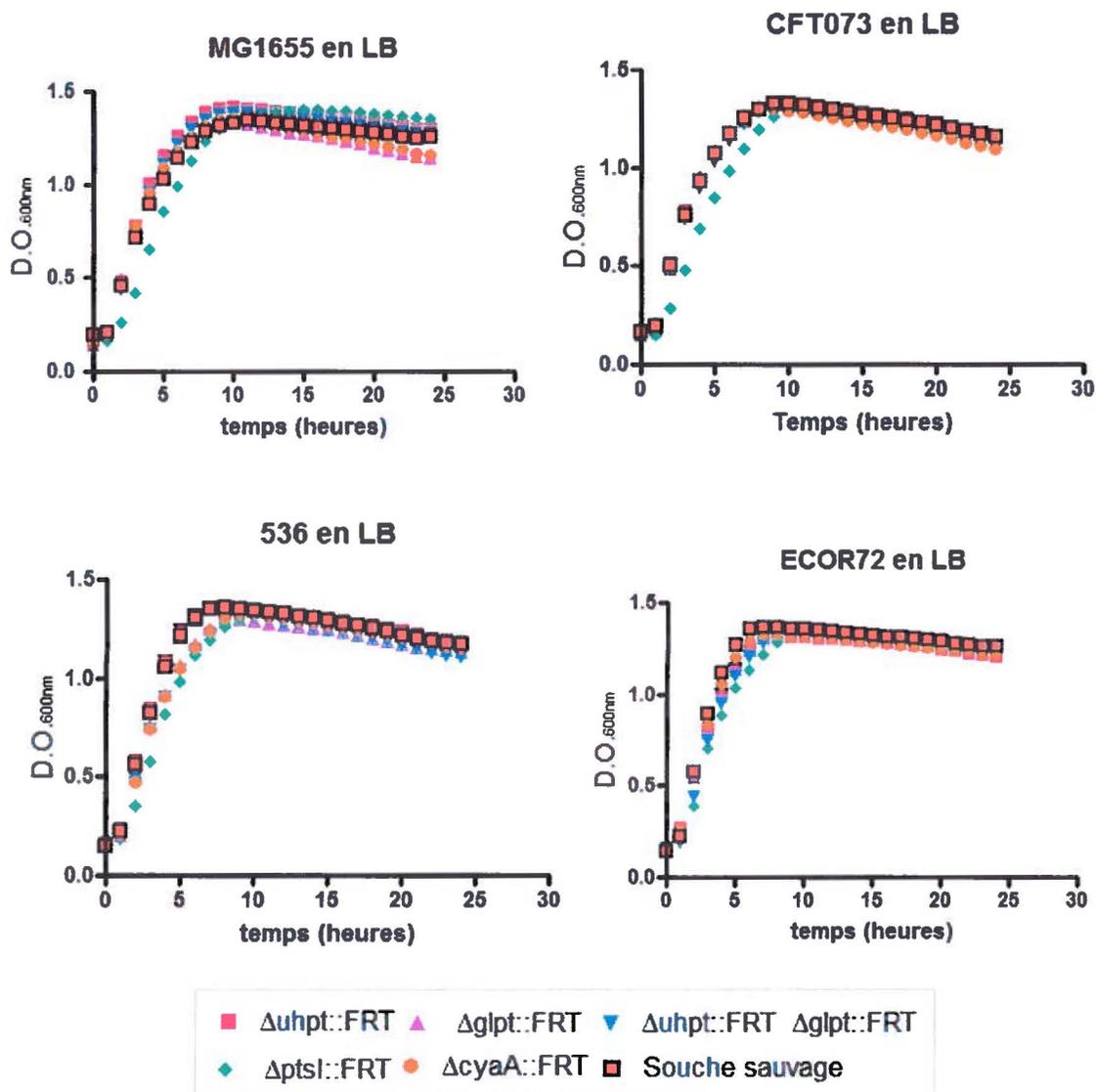


Figure 3.1 : Courbes de croissance des souches sauvages MG1655, CFT073, 536 et ECOR72 ainsi que de leurs différents mutants dirigés, obtenues en milieu riche LB

Les prises de D.O. à 600 nm ont été faites toutes les 15 min pendant 24 heures, à 37 °C avec agitation, par l'appareil *Bioscreen C*. Pour simplifier le visuel, seulement 1 point/heure est montré sur les courbes. Quatre réplicats biologiques ont été réalisés lors de l'établissement des courbes de croissance.

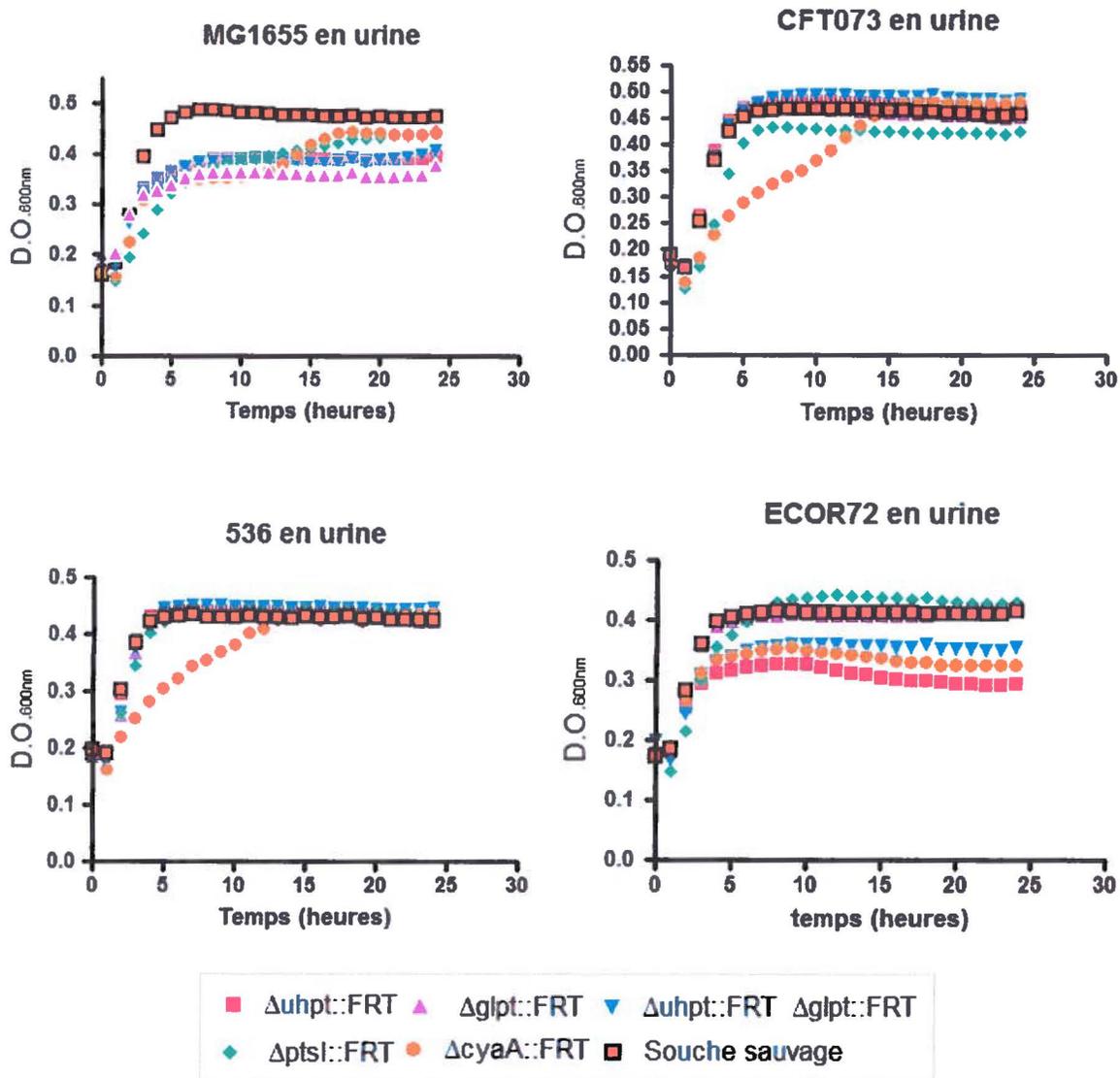


Figure 3.2 : Courbes de croissance des souches sauvages MG1655, CFT073, 536 et ECOR72 ainsi que de leurs différents mutants dirigés, obtenues en urine de femme

Les prises de D.O. à 600 nm ont été faites toutes les 15 min pendant 24 heures, à 37 °C avec agitation, par l'appareil Bioscreen C. Pour simplifier le visuel, seulement 1 point/heure est montré sur les courbes. Quatre répliquats biologiques ont été réalisés lors de l'établissement des courbes de croissance

3.2 Concentration minimale inhibitrice (CMI)

Nous avons déterminé la CMI de la fosfomycine pour les souches sauvages CFT073, MG1655, 536, ECOR72 et leurs mutants respectifs. Il s'agit de la plus petite concentration pouvant inhiber la croissance des bactéries. Ainsi, plus la CMI est petite, plus cela indique que la souche est sensible à l'antibiotique. Pour ce faire, nous avons utilisé la méthode des bandes de fosfomycine à gradient de diffusion (E-test). Le milieu Mueller-Hinton (MH) est le milieu de routine utilisé pour la détermination de la sensibilité aux antibiotiques. Nous avons également utilisé l'urine de femme (Ur) comme milieu, afin de nous rapprocher des conditions de croissance que rencontrent les UPEC dans le tractus urinaire. Les CMI obtenues sont présentées dans le Tableau 3.1 suivant :

Tableau 3.1 : Concentration minimale inhibitrice (CMI) de fosfomycine (en µg/ml)

	MG1655		536		CFT073		ECOR72	
	Urine	Mueller-Hinton	Urine	Mueller-Hinton	Urine	Mueller-Hinton	Urine	Mueller-Hinton
Sauvage	0,38	0,39	0,25	0,48	0,5	0,9	0,38	0,55
<i>ΔptsI</i>	1,5	2	0,5	1,5	S	3	1,25	2,25
<i>ΔcyaA</i>	2	3,5	8	8	8	10	3	3
<i>ΔuhpT</i>	0,5	48	6	30	8	64	10	24
<i>ΔglpT</i>	0,75	24	64	192	1	1	0,2	0,4
<i>ΔuhpTΔglpT</i>	128	R	96	R	64	R	128	R

CMI ont été déterminées après 18 à 20 heures d'incubation à 37 °C, sur gélose urine ou Mueller-Hinton. Ce sont les plus petites concentrations de fosfomycine lisibles sur les bandelettes de diffusion (E-test), ayant permis l'inhibition de la croissance des bactéries. La concentration minimale diffusée par un E-test de fosfomycine est 0,1 µg/ml et une souche inhibée à cette concentration est considérée comme étant sensible à l'antibiotique (S). La concentration maximale est de 1000 µg/ml, et une souche capable de croître à cette concentration est considérée comme étant résistante à l'antibiotique (R).

Plus la CMI est petite plus la souche est sensible, et inversement plus la CMI est grande plus la souche est résistante. On peut constater que les CMI des souches sauvages obtenues en MH et Ur sont plus petites que celles des mutants. Tel qu'attendu, les mutants sont plus résistants que les souches sauvages après culture sur les deux milieux. Il y a une exception pour ECOR72 où le

mutant *ΔglpT* a une CMI inférieure à celle de la souche sauvage en MH (0,4 μg/ml < 0,55 μg/ml) et en Ur (0,2 μg/ml < 0,38 μg/ml).

On peut constater également que, majoritairement, les CMI en urine sont beaucoup plus faibles que celles en MH. Les souches sauvages et les mutants sont beaucoup plus sensibles à la fosfomycine en Ur par rapport au milieu MH. L'exception concerne la souche sauvage MG1655, et les mutants 536 (*ΔcyaA*), ECOR72 (*ΔcyaA*) et CFT (*ΔptsI*) où les CMI sont identiques en Ur et MH.

Il est important de remarquer que les doubles mutants délétés des transporteurs de la fosfomycine (*ΔuhpTΔglpT*) sont totalement résistants à la fosfomycine en MH; contrairement en urine où ils ont une certaine sensibilité. C'est-à-dire qu'en MH, leur croissance n'est pas inhibée à la plus haute concentration de fosfomycine diffusée par le E-test, soit 1000 μg/ml. Tandis qu'en milieu Ur, les doubles mutants sont inhibés par des concentrations élevées de fosfomycine (> 64 μg/ml) (voir Tableau 3.1).

La croissance sur MH, LB et Ur supplémenté de 500 μg/ml et 1000 μg/ml de fosfomycine a été évaluée avec les mêmes inocula que ceux utilisés pour déterminer les CMIs et dans les mêmes conditions de croissance. Aucune colonie n'a été observée après 24 heures d'incubation à 37 °C (résultats non montrés).

3.3 Détermination du profil phénotypique

Les mutations testées dans cette étude affectent l'expression de transporteurs des sucres secondaires comme des sucres phosphatés, le mannose ou le lactose. Nous avons donc déterminé la capacité de croissance des souches sauvages MG1655, ECOR72, CFT072, 536 et leurs mutants dirigés respectifs en présence de différents sucres comme unique source de carbone. Cela a permis l'établissement d'un profil phénotypique caractéristique de la croissance de chaque souche sauvage et de chaque mutant. Les profils obtenus pour les souches sauvages et les mutants dirigés sont résumés dans le Tableau 3.2.

Les souches sauvages MG1655, 536, ECOR72 et CFT073, ainsi que leurs mutants complémentés (*ΔuhpT, attTn7 ::uhpT*) et (*ΔglpT, attTn7 ::glpT*), peuvent croître en présence de

tous les sucres utilisés comme unique source de carbone dans le milieu de culture (glucose, glycérol-3-phosphate (G3P), glucose-6-phosphate (G6P), mannose et lactose). Les mutants délétés des gènes codant pour les transporteurs de G6P (*ΔuhpT*) et de G3P (*ΔglpT*) ne peuvent respectivement pas croître en présence de G6P et G3P comme seule source de carbone. Les doubles mutants (*ΔuhpT ΔglpT*) ne peuvent pas croître en présence de G6P, ni de G3P, comme source de carbone. Les mutants *ΔptsI* et *ΔcyaA* ne survivent pas en présence de lactose et de mannose comme unique source de carbone. Les différences de croissance entre ces derniers sont que les mutants *ΔptsI* ont de la difficulté à croître en présence seulement de glucose, et que les mutants *ΔcyaA* ne démontrent aucune croissance avec seulement du G3P comme seul apport de carbone dans leur milieu (voir Tableau 3.2).

Tableau 3.2: Profil phénotypique des souches sauvages MG1655, ECOR72, 536, CFT073 et de leurs mutants dirigés

	Sauvages et complémentées	<i>ΔuhpT</i>	<i>ΔglpT</i>	<i>ΔuhpTΔglpT</i>	<i>ΔptsI</i>	<i>ΔcyaA</i>
Glucose	+	+	+	+	+ / -	+
G6P	+	-	+	-	+	+
G3P	+	+	-	-	+	-
Mannose	+	+	+	+	-	-
Lactose	+	+	+	+	-	-

Les souches sauvages MG1655, 536, CFT073, ECOR72, leurs mutants dirigés et souches complémentées ont été étalés sur géloses M9 supplémentées de glucose, glucose-6-phosphate (G6P), glycérol-3-phosphate (G3P), mannose ou lactose. La croissance a été observée après 48 h d'incubation à 37 °C.

3.4 Agglutination sur levure

Les tests d'agglutination sur levure ont été effectués afin d'observer l'effet des mutations menant à la résistance à la fosfomycine sur la production de fimbriae type 1. Les fimbriae type 1 reconnaissent les résidus mannoses à la surface des levures. Ainsi, plus les bactéries expriment type 1, plus elles s'agglutinent aux levures. Les souches utilisées sont donc MG1655, 536, CFT073, ECOR72 et les mutants respectifs. Les tests ont été effectués en LB à D.O. $_{600nm}$ de 0,6, c'est-à-dire lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance. L'urine n'a pas été utilisée comme milieu de croissance pour ce test, car pour une même phase de croissance les bactéries sont moins nombreuses en urine qu'en milieu riche. Les titres d'agglutination sont difficilement lisibles si la quantité de bactéries n'est pas suffisante. Cela ne permet pas de visualiser une agglutination à l'œil nu.

Selon les résultats de la Figure 3.3, la souche MG1655 et ses mutants dirigés respectifs agglutinent moins que les autres souches et mutants. MG1655 est une souche de laboratoire dite avirulente. Elle possède moins de gènes que les souches infectieuses ECOR72, CFT073 et 536, dont certains gènes nécessaires à la virulence (Blattner *et al.*, 1997, Brzuszkiewicz *et al.*, 2006, Welch *et al.*, 2002). On s'attend donc à ce qu'elle ait des capacités d'adhérences inférieures à celles des autres souches testées. En revanche, il n'y a pas de différence significative entre l'agglutination des souches sauvages MG1655 et ECOR72 et leurs mutants dirigés respectifs. Les mutations ne semblent pas affecter significativement l'expression des fimbriae type 1 chez ces 2 souches. Pour 536, l'agglutination des mutants $\Delta cyaA$ et $\Delta ptsI$ est significativement plus faible que celle de la souche sauvage. Pour CFT073, c'est le mutant $\Delta cyaA$ qui présente une agglutination significativement plus faible que celle de la souche sauvage. Les mutations affectant la synthèse d'AMPc et l'utilisation de sucres secondaires, $\Delta ptsI$ et $\Delta cyaA$, semblent diminuer l'expression de type 1 chez les souches 536 et CFT073. Les mutations affectant les transporteurs de la fosfomycine ne semblent pas affecter le niveau de production des fimbriae de type 1.

Agglutination sur levure

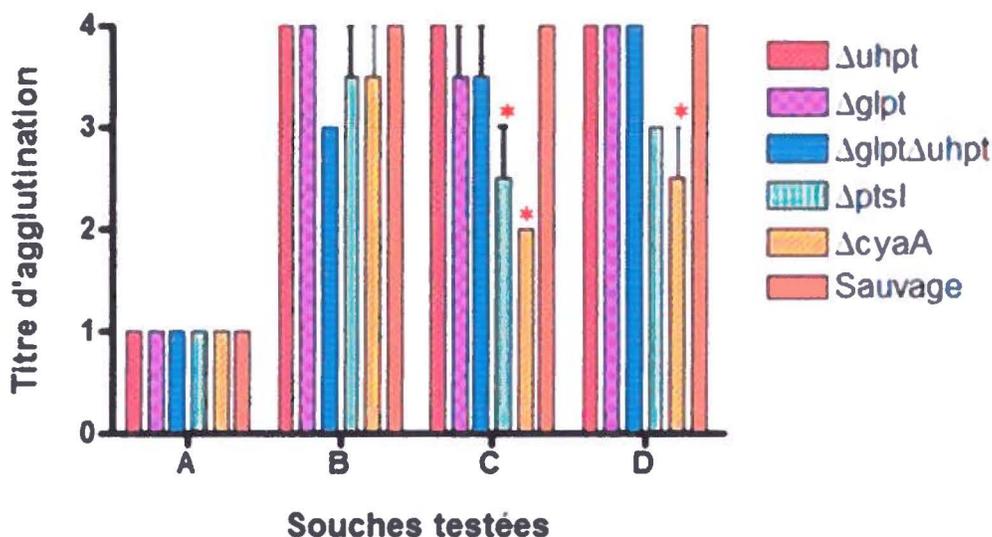


Figure 3.3 : Agglutination sur levure des souches sauvages MG1655 (A), ECOR72 (B), 536 (C), CFT073 (D) et leurs mutants dirigés.

Les bactéries ont été cultivées en LB. Les tests ont été effectués à $D.O_{600nm}$ 0,6, afin que les bactéries soient en phase exponentielle de croissance. La dilution effectuée correspond au carré du titre d'agglutination. Par exemple, un titre d'agglutination de 4 correspond à une dilution de 16 fois. La lecture du titre a été effectuée après 30 min de contact entre bactéries et levures placées sur glace. Le test statistique utilisé est le test t de Student (* $P < 0.05$).

3.5 Coinfection de souris

Comme détaillé dans la revue de littérature, les modèles d'infection *in vivo* permettent d'effectuer des tests dans des conditions qui se rapprochent des conditions d'infection réelles. Nous avons utilisé des souris afin de tester en coinfection les souches CFT073 (*Alac*) et CFT073 (*ΔuhpT ΔglpT*) dans un modèle d'infection ascendante du tractus urinaire. Cela permet de mettre en compétition les deux souches testées et de pouvoir facilement observer les différences au niveau de leur capacité d'infection en présence de l'une et l'autre. Le \log_{10} d'UFC/ml d'homogénat de tissu a été calculé pour chaque souche, dans chaque organe cible (les 2 reins et la vessie), cela pour chaque souris. Il est représenté sous forme de point dans les graphiques ci-dessous.

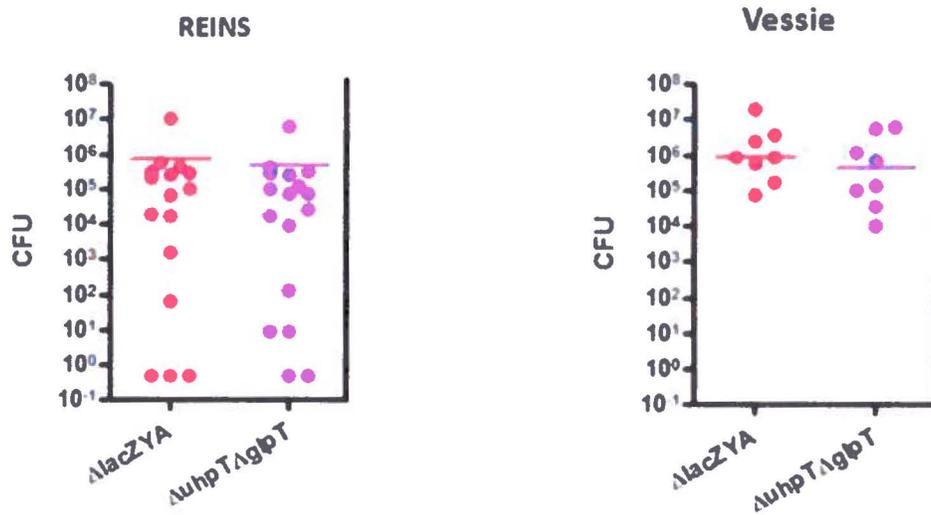


Figure 3.4: Colonisation de la vessie et des reins de souris CBA/J co-infectées avec les souches virulentes CFT073 ($\Delta lacZYA$) et le mutant dérivé CFT073 ($\Delta uhpT\Delta glpT$)

Les organes ont été prélevés 48 heures après infection. Les points représentent le \log_{10} des UFC/ml d'homogénat de tissus, pour chaque organe dans chacune des souris. Les résultats présentés pour les reins comprennent les reins, droit et gauche, de chaque souris. Les barres horizontales représentent la médiane des \log_{10} des UFC. Le test statistique utilisé est le *Wilcoxon matched pairs* (* $P < 0,05$).

On peut constater qu'il n'y a pas de différence significative entre les \log_{10} des UFC dénombrées dans la vessie pour la souche virulente au phénotype sauvage, CFT073 ($\Delta lacZYA$) et son double mutant ($\Delta uhpT\Delta glpT$). Les mutations ne semblent pas affecter la capacité d'infection du mutant. Il peut compétitionner avec la souche sauvage, et ne semble pas atténué dans la vessie. Il en est de même dans les reins, le mutant CFT073 ($\Delta uhpT\Delta glpT$) semble pouvoir infecter autant que la souche au phénotype sauvage (voir Figure 3.4).

3.6 Fréquence spontanée de génération de mutants résistants à la fosfomycine

Lors de la colonisation d'une niche écologique par les bactéries, la pression de l'environnement favorise la propagation des clones porteurs de mutations pathoadaptatives ; c'est à dire qui procure un avantage sélectif à la bactérie. Nous avons déterminé la fréquence de génération de mutations spontanées (FM) menant à la résistance à la fosfomycine. Plusieurs milieux de culture ont été pris en compte, afin d'observer et comparer les variations de FM sur ces derniers. Le milieu Mueller-Hinton (MH) a été utilisé, car c'est le milieu standardisé pour déterminer la sensibilité aux antibiotiques et le LB, parce que c'est le milieu standardisé utilisé pour la culture d'*E. coli* en laboratoire. Le MH complémenté avec du glucose-6-phosphate (MH-G6P), est un milieu standardisé pour la vérification de résistance à la fosfomycine. L'utilisation d'urine humaine permet de se rapprocher du milieu de croissance que rencontrent les UPEC lors d'une infection du tractus urinaire.

Nous avons préalablement déterminé les UFC des 4 souches sur ces différents milieux (LB, MH, MH-G6P, LB-G6P et urine), et ce, sans fosfomycine. Nous avons utilisé les mêmes conditions de croissance que celles employées lors de la détermination des FM, afin de vérifier si le milieu seul influe sur la croissance des bactéries. Après incubation, les UFC obtenues sont les mêmes respectivement pour les 4 souches, sur tous les milieux. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.5. Les fréquences de résistances spontanées obtenues sont présentées dans la Figure 3.6.

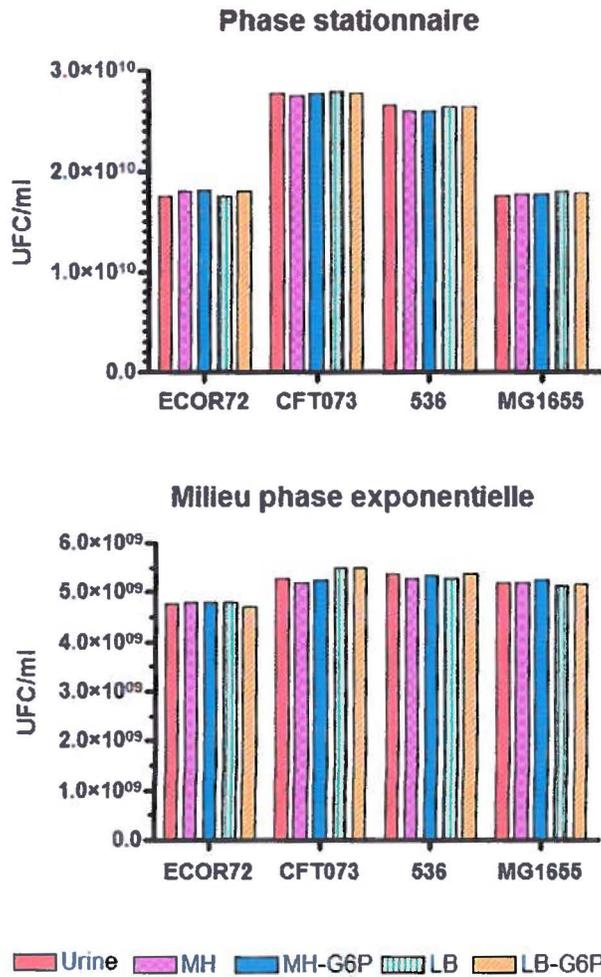


Figure 3.5: Nombre d'unité formatrice de colonie par millilitre de milieu (UFC/ml), pour les souches ECOR72, CFT073, 536 et MG1655, en phase de croissance exponentielle et stationnaire.

Les UFC ont été déterminées après 18h d'incubation à 37 °C sur les milieux en gélose suivants: urine, Mueller-Hinton (MH), Luria-Bertani (LB), LB et MH supplémentés de 25 µg/ml de glucose-6-phosphate (LB-G6P et MH-G6P). Les décomptes ont été effectués en milieu de phase de croissance exponentielle et en phase stationnaire.

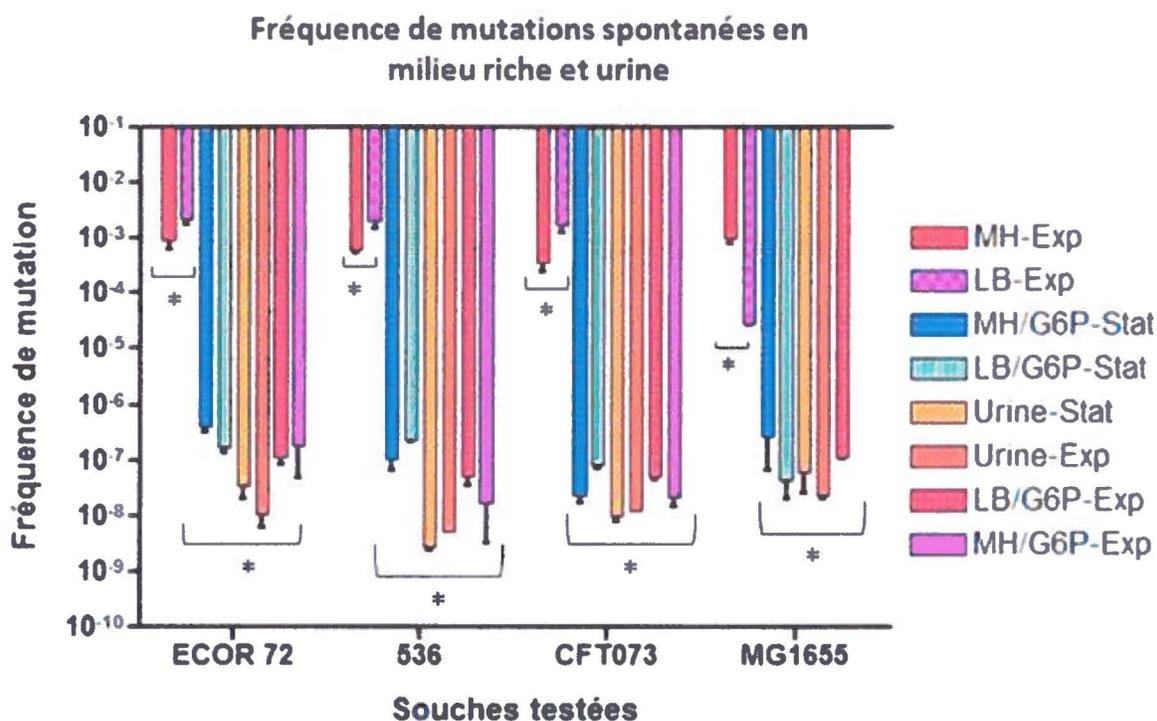


Figure 3.6 : Fréquence de génération de mutations spontanées des souches ECOR72, 536, CFT073 et MG1655

La fréquence de mutation spontanée (FM) a été déterminée pendant la phase stationnaire (Stat) et exponentielle (Exp) de croissance. Différents milieux en gélose ont été utilisés : Mueller-Hinton (MH), LB, MH supplémenté de 25 µg/ml de glucose-6-phosphate (MH-G6P) et urine de femme. La FM correspond au ratio du nombre de bactéries avec croissance en présence de fosfomycine sur le nombre total de bactéries inoculées au départ. Les décomptes des UFC ont été effectués après 18h heures d'incubation à 37 °C. Les concentrations de fosfomycine utilisées diffèrent pour chaque souche. Elles correspondent à environ 10X la concentration minimale inhibitrice de chacune des souches : CFT073 (9 µg/ml), MG1655 (4 µg/ml), 536 et ECOR72 (5,5 µg/ml). Le test statistique utilisé est l'ANOVA (* P<0,05).

Il est important de remarquer que les 4 souches, en phase exponentielle, ont une FM significativement supérieure sur milieux MH et LB, par rapport à celles obtenues sur les autres milieux, MH-G6P, LB-G6P et urine. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les FM obtenues sur ces autres milieux. Il n'y en a pas non plus entre les FM obtenues sur MH et LB. Il y a donc plus de mutations de résistance à la fosfomycine qui apparaissent sur LB et MH que sur urine et les milieux supplémentés de G6P. Les souches semblent mieux adaptées à développer une résistance en présence de fosfomycine sur les milieux MH et LB que sur urine.

La souche K-12, MG1655, n'a produit aucun mutant spontané sur MH-G6P en phase exponentielle. MG1655 en phase exponentielle est sensible à la concentration de fosfomycine

utilisée. Il n'y a eu aucune croissance sur les géloses MH-G6P, il n'y a donc pas de résultats correspondants. De même, la FM n'a pas été déterminée sur MH et LB après croissance en phase stationnaire, car à ce stade de croissance, les 4 souches sont résistantes aux concentrations de fosfomycine utilisées. C'est-à-dire qu'en phase stationnaire, elles poussent aussi bien en présence de l'antibiotique que sans antibiotique, avec des concentrations 10 fois supérieures à la CMI.

3.7 Gènes potentiellement mutés chez les mutants spontanés résistants à la fosfomycine

Nous avons conservé certains clones, parmi les mutants spontanés résistants à la fosfomycine générés en urine ou milieux riches, lors de la détermination de la FM (voir section 3.6). Leur croissance en présence de différents sucres (G3P, G6P, mannose, lactose, glucose) comme unique source de carbone a été testée. Cela a permis de déterminer le profil phénotypique de ces mutants spontanés. Ainsi, selon les capacités de croissance des mutants spontanés, par comparaison avec les profils des mutants dirigés obtenus (voir Tableau 3.2), nous avons pu déterminer les gènes possiblement mutés ayant permis la résistance à l'antibiotique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.3

Tableau 3.3 : Gènes potentiellement mutés chez les mutants spontanés des souches ECOR72, CFT073, 536 et MG1655, générés en urine et milieux riches

	Urine		Milieux riches (MH, MH-G6P, LB)	
	Nombre de mutants testés	Pourcentage (%)	Nombre de Mutants testés	Pourcentage (%)
<i>ptsI/cyaA</i>	49	68	48	26,4
<i>uhpT/glpT</i>	0	0	134	73,6
ND	23	32	0	0
Total	72	100	182	100

ND : Non Déterminé ; MH : Mueller-Hinton ; MH-G6P : Mueller-Hinton supplémenté de 25 µg/ml de Glucose-6-Phosphate ; LB : Luria-Bertani. Les clones notés ND n'ont pu être classés dans aucune catégorie, car ne possédaient aucun phénotype associables à une des délétions recherchées. Les résultats obtenus sur milieux riches ont été combinés afin de mettre en évidence les différences observées avec les résultats obtenus en urine.

On peut constater que les mutations affectant les gènes des transporteurs, *uhpT* et *glpT*, semblent apparaître plus fréquemment chez les mutants générés en milieux riches, qu'en urine. Plus de la moitié des clones obtenus sur milieux riches, soit 73 % des mutants de l'échantillon, semblent porter une mutation affectant ces gènes. À l'inverse, les mutations affectant les gènes régulateurs *ptsI* et *cyoA* semblent prédominantes en urine. En effet, 68 % des mutants générés en urine paraissent présenter ce genre de mutations.

Il est important de constater qu'en urine, 32 % des mutants testés semblent être porteurs de mutations que l'on ne peut pas déterminer par observation des phénotypes (voir ND dans le Tableau 3.3). Ces clones ont un profil qui n'est comparable à aucun de ceux pré-déterminés avec les mutants dirigés. Ils peuvent croître en présence de tous les sucres testés sur milieu minimal : glucose, G6P, G3P, mannose et lactose (résultats non montrés). Ils ne semblent donc pas être porteurs d'une délétion affectant les gènes correspondants. Ils peuvent être porteurs d'une mutation de résistance à la fosfomycine, autre que celles affectant les gènes *ptsI*, *cyoA*, *uhpT* et *glpT*.

Ainsi, en fonction du profil phénotype nous avons fait séquencer certains de ces gènes potentiellement mutés ainsi que leur promoteur. Nous avons séquencé les gènes *glpT*, *uhpT*, *cyoA* et *ptsI*. Nous avons également fait séquencer le gène *murA* de certains clones au phénotype non déterminé. Il s'agit d'un gène essentiel, aussi impliqué dans la résistance à la fosfomycine. Les séquences obtenues ont été comparées aux séquences appartenant aux souches sauvages, afin de déterminer les mutations survenues. Aucune modification n'a été observée au niveau des promoteurs séquencés et certains gènes ne présentent pas de mutations. Les résultats sont présentés dans le Tableau 3.4 suivant :

Tableau 3.4 : Mutations de résistance à la fosfomycine identifiées chez les souches testées

Souches	Gènes séquencés	Mutations géniques	Mutations protéiques*
	<i>glpT</i>		
MSLB536 ₂₁		G ₁₃₄₂ →A ₁₃₄₂	Glu448Lys
MSLB536 ₁₆		G ₁₃₄₂ →A ₁₃₄₂	Glu448Lys
MSLB72 ₅		G ₁₃₄₂ →A ₁₃₄₂	Glu448Lys
MSLB73 ₁₈		G ₁₃₄₂ →A ₁₃₄₂	Glu448Lys
MSUrExMG ₁₁		G ₁₃₄₂ →A ₁₃₄₂	Glu448Lys
MSLB73 ₁₄	<i>glpT</i>	C ₂₆₉ →A ₂₆₉	Codon stop TAA 452 aa→ 89aa, protéine tronquée
MSUrMG ₁₁		Aucune	
MSLBMG ₂₃		Aucune	
MSUr72 ₅		Aucune	
	<i>uhpT</i>		
MSG6P72 ₁		Large délétion*	Protéine tronquée 463aa → 13 aa
MSG6P72 ₅		Large délétion*	Protéines tronquée 463aa → 13 aa
MSLB536 ₁		Insertion A position 30_31	Cadre de lecture déplacé, codon stop TAA, 463aa→ 83aa, protéine tronquée,
MSLB73 ₉		C ₈₈₆ →T ₈₈₆ / A ₁₇₁ →C ₁₇₁	Val295Leu / Gln30Pro
MSLB73 ₄		C ₁₇₁ →T ₁₇₁	Val295Leu
MSMH536 ₁		Aucune	
MSLB72 ₂		Aucune	
MSLB MG ₁₉		Aucune	
MSLBMG ₂₂		Aucune	
	<i>cyaA</i>		
MSUr73 ₂		Insertion G position 2235_2236	Cadre de lecture déplacé, codon stop TAA, 2745aa→ 755aa, protéine tronquée
MSUr536 ₁		Délétion G ₆₉₀	Cadre de lecture déplacé, codon stop TAA, 2745aa→ 234aa, protéine tronquée
	<i>ptsI</i>		
MSUr72 ₁₂		Aucune	
MSUr75 ₅		Aucune	

Souches	Gènes séquencés	Mutations géniques	Mutations protéiques*
	<i>MurA</i>		
MSUr536 ₄		Aucune	
MSUr74 ₄		Aucune	
MSUr72 ₁		Aucune	
MSUrMG ₁		Aucune	

*Délétion vérifiée par PCR, aa = acide aminé

Chapitre 4 : Discussion

4.1 Courbe de croissance

L'objectif principal de ce projet est d'apporter une explication à la différence observée entre le taux de mutation de résistance à la fosfomycine observée *in vivo* et *in vitro*. Nous avons inactivé les gènes dont la mutation peut apporter une résistance à la fosfomycine. Ces gènes sont *glpT*, *uhpT*, *pstI* et *cyaA*, ils ont été supprimés chez les souches CFT073, 536, ECOR72 et MG1655. Des études précédentes proposent l'hypothèse selon laquelle les mutations de résistance imposent un coût biologique aux UPEC, diminuant leur capacité à persister dans le tractus urinaire. Nous avons voulu observer la croissance de ces mutants en absence de fosfomycine sur les différents milieux utilisés lors des tests. Cela permet de déterminer si ces mutations seules affectent la capacité de croissance des souches. L'urine a été choisie, car c'est le milieu qui permet de se rapprocher le plus des conditions *in vivo* de croissance, que sont susceptibles de rencontrer les UPEC dans le tractus urinaire. Nous avons utilisé uniquement l'urine de femme, car les ITU communautaires touchent principalement les femmes (Lobel *et al.*, 2007). Comme milieu de croissance de routine en laboratoire nous avons utilisé le LB.

Pour les 4 souches testées, les délétions n'affectent pas leur croissance en LB (voir Figure 3.1), ce qui semble normal pour les mutants $\Delta uhpT$, $\Delta glpT$, et $\Delta uhpT\Delta glpT$. Les transporteurs de sucre phosphate UhpT et GlpT, codés par les gènes *uhpT* et *glpT*, sont des transporteurs secondaires principalement actifs en présence respectivement de G6P et G3P comme source de carbone dans le milieu. En présence d'autres sources de carbone, comme c'est le cas en milieu riche, l'absence de ces protéines ne devrait pas affecter la croissance (Hall, 1999, Lemieux *et al.*, 2004). Pour les mêmes raisons, on peut expliquer la croissance similaire en urine entre les souches sauvages CFT073 et 536, leurs mutants $\Delta uhpT$, $\Delta glpT$, $\Delta uhpT\Delta glpT$ et $\Delta ptsI$ à celle de leur souche parentale (voir Figure 3.2). Nous pouvons expliquer la croissance des mutants $\Delta ptsI$ de plusieurs façons. Premièrement, ils devraient quand même être capables d'internaliser certains carbohydrates grâce à un procédé alternatif de diffusion facilité à travers la membrane (Saier *et al.*, 1971). Deuxièmement, en milieu LB les sources de carbone sont essentiellement différents acides aminés, dont le transport n'est pas dépendant du système Pts (Hull *et al.*, 1997, Sezonov *et al.*, 2007). Cela permettrait de pallier cette délétion qui provoque l'altération de la cascade de phosphorylation aboutissant à l'expression de transporteurs de sucres secondaires (Kok *et al.*, 2003). Le tout permettrait aux mutants $\Delta ptsI$ de compenser la perte du gène.

On pourrait s'attendre à un retard de croissance de la part des mutants *ΔcyaA*. Ils ne peuvent synthétiser l'AMPc, un régulateur important de la transcription de gènes impliqués dans l'importation et l'utilisation de sucres secondaires et de certains acides aminés (Curtiss *et al.*, 1987). L'AMPc régule négativement l'expression du facteur de résistance au stress σ^S , codé par le gène *rpoS*. Ce dernier permet l'activation de gènes impliqués dans l'entrée en phase stationnaire (Battesti *et al.*, 2011, Loewen *et al.*, 1998). Inversement, l'AMPc active l'expression du facteur σ^{70} , exprimé pendant la phase de croissance et permet la synthèse de gènes impliqués dans la multiplication cellulaire (Tian *et al.*, 2001). Ainsi nous pouvons déduire que la délétion du gène *cyaA* induit un défaut dans l'expression des facteurs σ^S et σ^{70} , et donc des difficultés de croissance et des difficultés à atteindre la phase stationnaire. Cependant, on constate qu'en présence de sources de carbone abondantes et dans des conditions de croissance favorables, les bactéries ont une croissance similaire à celle des souches sauvages. Une étude chez *E. coli* a déjà montré que des mutants *ΔrpoS* compensaient le manque par l'utilisation de facteurs sigma alternatifs (Notley-McRobb *et al.*, 2002).

Les sources de carbone en urine sont principalement différents acides aminés, du citrate et des composés ioniques, ce qui permettrait aux mutants de compenser la perte de ces gènes (Hull *et al.*, 1997, Taylor *et al.*, 2006). En revanche, un retard de croissance pour les courbes de croissance des mutants *ΔcyaA* s'explique bien. L'urine est un milieu acide, limité en nutriment (Brooks *et al.*, 1997, Taylor *et al.*, 2006). C'est donc un facteur de stress pour la bactérie. Le retard de croissance s'expliquerait pour les raisons mentionnées précédemment. L'absence d'AMPc diminue la résistance au stress des cellules et compromet l'expression de gènes nécessaires à la multiplication cellulaire. En situation de stress et en présence de nutriments limités, on peut supposer que les cellules prennent plus de temps à compenser le manque des facteurs σ^S et σ^{70} , cela expliquerait le retard de croissance observé. Ces mutants atteignent néanmoins une DO_{600} en phase stationnaire identique à celle des souches sauvages. Il a déjà été démontré aussi que des mutants *ΔrpoS* et *ΔcyaA* présentent une croissance ralentie par rapport à leur souche sauvage respective en milieu limité (Curtiss *et al.*, 1987, Notley-McRobb *et al.*, 2002).

On peut en déduire que ces mutations en milieu riche et en urine, n'affectent pas la capacité de croissance des souches testées, à l'exception de la délétion du gène *cydA* qui ralentit la croissance en urine.

Il serait intéressant pour compléter cette étude, d'observer la courbe de croissance des souches sauvages et des mutants sur LB-G6P, MH et MH-G6P. L'amidon contenu dans le milieu MH (Neogen_corp., 3 juin 2011) et la présence de G6P influenceraient la croissance des souches et amélioreraient leur croissance.

4.2 Concentration minimale inhibitrice

L'objectif étant de comprendre la différence entre la FM observée *in vivo* et celle observée *in vitro*, nous avons déterminé la CMI de fosfomycine pour les souches sauvages et les mutants dirigés afin de les comparer, sur gélose MH et urine (voir Tableau 3.1). Les mutants résistants, comme on s'y attend, sont moins sensibles que les souches sauvages. À l'exception des doubles mutants $\Delta uhpT\Delta glpT$, toutes les souches testées peuvent être considérées comme étant sensibles à la fosfomycine en urine et MH. Elles ont une CMI inférieure aux concentrations définies par l'EUCAST ($\leq 64 \mu\text{g/ml}$) et le CLSI ($\leq 132 \mu\text{g/ml}$) comme point limite de sensibilité. Les mutants $\Delta uhpT\Delta glpT$ ont une CMI entre $62 \mu\text{g/ml}$ et $128 \mu\text{g/ml}$ et peuvent être considérés comme étant sensibles à la fosfomycine selon le CLSI et comme ayant une sensibilité intermédiaire à la fosfomycine selon l'EUCAST. Une exception concerne les mutants 536 $\Delta glpT$ en urine et MH qui ont une sensibilité intermédiaire à la fosfomycine selon les deux comités, car leurs CMI sont respectivement $64 \mu\text{g/ml}$ et $192 \mu\text{g/ml}$ (CLSI, 2012, Kahlmeter *et al.*, 2012).

Le transporteur de G6P, UhpT, est prédominant dans l'internalisation de la fosfomycine, par rapport au transporteur de G3P, GlpT (Frederick M. Kahan *et al.*, 1974). Nos résultats de CMI corrént avec la littérature. En effet, la CMI des mutants $\Delta uhpT$ est plus élevée que celle des mutants $\Delta glpT$. La délétion du gène *uhpT* procure une plus grande résistance aux mutants que la délétion du gène *glpT*, chez les souches CFT073, ECOR72 en urine et MH et chez la souche MG1655 en MH. Cela confirme que le transporteur UhpT est plus impliqué dans l'entrée de la fosfomycine dans la cellule que le transporteur GlpT. La souche 536 fait exception, car la

délétion du gène *glpT* lui procure une plus grande résistance que la délétion de *uhpT* en urine et sur MH. La CMI des mutants 536 Δ *glpT* est supérieure à celle des mutants 536 Δ *uhpT*. Nous pouvons expliquer cette différence par la présence de 427 gènes chez 536, qui sont absents chez les autres souches de *E. coli* recensées (Donnenberg, 2013). Ces gènes supplémentaires pourraient influencer sur l'expression et le fonctionnement des transporteurs UhpT et GlpT. Le mutant MG1655 Δ *glpT* a une CMI légèrement plus élevée que le mutant MG1655 Δ *uhpT* en urine. Cette différence peut être attribuée au changement de milieu pour la souche MG1655. Lors de la poursuite de l'étude, on pourrait vérifier le regain de la sensibilité chez des mutants complémentés des différentes souches.

La CMI de fosfomycine pour *E. coli* a été déterminée entre 1 et 4 μ g/ml (Barry *et al.*, 1991). De plus, lors de test de résistance avec des concentrations de fosfomycine égales à celles retrouvées dans la vessie lors de la prise de comprimés simple dose (500 μ g/ml et 100 μ g/ml), aucune croissance n'a été observée sur les géloses urine, MH et LB. Cela confirme que les doses administrées sont létales pour les UPEC testées.

Il est intéressant de constater les différences entre les CMI obtenues en urine et MH. Les CMI sont beaucoup plus faibles en urine que sur MH. Il est déjà connu que l'efficacité de cet antibiotique augmente en urine (Greenwood *et al.*, 1987). Les doubles mutants Δ *uhpT Δ *glpT* sont totalement résistants sur MH. Cela confirme que les transporteurs de sucres phosphates GlpT et UhpT, codés par ces gènes, sont les seules portes d'entrée de la fosfomycine dans la cellule. Celle-ci ne peut plus pénétrer dans les cellules, qui deviennent résistantes. Un fait intéressant est qu'en urine les doubles mutants regagnent une sensibilité intermédiaire à la fosfomycine (CMI entre 62 μ g/ml-128 μ g/ml). On peut en déduire deux hypothèses : qu'il existe une porte d'entrée supplémentaire pour la fosfomycine, induite en urine, ou que l'inactivation des deux transporteurs de façon simultanée permet l'expression d'un autre transporteur pour cet antibiotique. On pourrait éventuellement supposer l'utilisation, par la fosfomycine, de transporteur d'acides aminés, de citrate ou d'autres composés phosphatés, qui font partie des sources de carbone principales présentes en urine (Hull *et al.*, 1997, Taylor *et al.*, 2006). Cela ouvre la voie à d'autres investigations pour compléter cette étude.*

La sensibilité à l'antibiotique des souches porteuses de mutations de résistance et la possible présence d'une porte d'entrée supplémentaire pour la fosfomycine en urine pourraient expliquer le faible taux de mutants résistants retrouvés dans les cas cliniques d'ITU.

4.3 Test d'agglutination sur levure

L'une des hypothèses pouvant expliquer la différence entre la FM de résistance à la fosfomycine *in vivo* et *in vitro* est que, les mutations de résistances imposent un coût biologique aux UPEC, les rendant ainsi désavantagées pour infecter et survivre dans le tractus urinaire. Nous avons donc vérifié si les mutations de résistance à la fosfomycine influent sur l'expression du fimbriae de type 1, en faisant un test d'agglutination sur levure (voir Figure 3.3). Les fimbriae type 1 sont essentiels pour la colonisation du tractus urinaire, notamment la vessie. Ils permettent l'adhésion aux cellules uroépithéliales. Une diminution de ces fimbriae diminuerait les capacités de colonisation des souches testées (Crépin *et al.*, 2012b, Jennifer Snyder *et al.*, 2006).

On peut observer une différence significative de l'agglutination sur levure entre les mutants délétés des gènes régulateurs $\Delta ptsI$ et $\Delta cyaA$ et les souches sauvages. Ces derniers agglutinent moins que les souches non mutées. Cela signifie que les mutants $\Delta ptsI$ et $\Delta cyaA$ produisent moins de fimbriae de type 1, et seraient moins susceptibles de pouvoir coloniser le tractus urinaire. Ces résultats correspondent à la littérature. Ces gènes sont reconnus comme étant liés à la virulence chez *E. coli*, notamment l'AMPc synthétisé par *cyaA*, qui est impliqué dans la régulation des fimbriae (Müller *et al.*, 2009). Des tests *in vivo* chez *Salmonella* ont montrés que la délétion de *cyaA* diminue la virulence, la production de fimbriae type 1 et la capacité d'infection (Curtiss *et al.*, 1987). D'autres tests ont montré que la délétion de *ptsI* diminue la capacité d'infection dans le tractus urinaire (Kok *et al.*, 2003). On peut donc supposer que ces deux mutations imposent un coût biologique aux cellules et pourraient diminuer leur capacité de persister dans le tractus urinaire.

On n'observe aucune différence significative entre les souches sauvages et les mutants délétés des transporteurs de la fosfomycine $\Delta uhpt$, $\Delta glpT$, $\Delta uhpT\Delta glpT$. Ces mutants produisent type 1 de façon équivalente, et donc on peut dire que ces mutations semblent ne pas affecter la production du fimbriae. Cependant, les tests sur levure sont dérivés des tests d'hémagglutination, lesquels sont approximatifs et ne corrént pas toujours avec les tests *in vivo* (Kisielius *et al.*,

1989). Il faut dans l'idéal compléter ces résultats avec des tests d'infection ascendante du tractus urinaire sur un modèle murin. Alors en considérant que des tests *in vivo* avec $\Delta ptsI$ et $\Delta cyaA$ ont déjà été pratiqués chez *Salmonella* nous avons effectué un test de coinfection de souris avec la souche sauvage CFT073 et son double mutant $\Delta uhpT\Delta glpT$.

Cependant, pour compléter l'étude, des tests d'infection dans un modèle murin devraient être faits avec les mutants $\Delta ptsI$ et $\Delta cyaA$ chez les UPEC. Nous n'avons pas pu effectuer ces tests par manque de temps.

4.4 Coinfection de souris

Comme mentionné précédemment nous avons effectué des coinfections de souris avec les souches sauvages CFT073 et son double mutant respectif. Nous évaluons ainsi la capacité de ce mutant à pouvoir compétitionner avec la souche sauvage respective (voir Figure 3.4). Selon les résultats on peut dire que le mutant CFT073 $\Delta uhpT\Delta glpT$ infecte les reins et la vessie autant que la souche sauvage. Il peut causer aussi bien des cystites que des pyélonéphrites. On peut en déduire que les mutations $\Delta uhpT$ et $\Delta glpT$ n'affectent pas la capacité d'infection de la souche CFT073 testée. On peut aussi en déduire que ces mutations n'ont pas de coût biologique. Des études précédentes ont déjà démontré que la suppression du transporteur GlpT chez *P. aeruginosa*, un autre pathogène urinaire, n'affecte pas le coût biologique de la bactérie (Castañeda-García *et al.*, 2009, Rodríguez-Rojas *et al.*, 2010). Ces résultats corrélerent avec les tests d'agrégation sur levure, analysés dans la section précédente. Les mutants $\Delta uhpT$ et $\Delta glpT$ y démontrent une production de type 1 similaire à celle des souches non mutées, ce qui laissait supposer qu'ils pourraient coloniser le tractus urinaire aussi bien que ces derniers.

Un groupe de 10 souris a été utilisé pour la coinfection. Pour la continuité du projet un plus grand groupe devrait être utilisé et permettrait potentiellement d'observer des différences significatives entre les souches testées.

4.5 Fréquence de mutation spontanée

Par la suite, nous avons déterminé la fréquence de mutations spontanées de résistance à la fosfomycine sur différents milieux riches et en urine, pour les souches sauvages ECOR72, 536, CFT073 et MG1655 (voir Figure 3.6). Nous voulons déterminer si le milieu affecte la génération spontanée de mutants résistants. Nous avons utilisé les milieux LB et MH. Le milieu LB est le milieu de culture de routine pour *E. coli* en laboratoire. Le milieu MH est utilisé de routine pour les tests de sensibilité aux antibiotiques, et il est reconnu que les CMI de fosfomycine sont plus faibles sur MH que sur LB. Cela serait dû au fait que le milieu MH est riche en phosphate qui permettrait une augmentation de l'expression des transporteurs UhpT (Barry *et al.*, 1991). Les tests de sensibilité à la fosfomycine sur gélose ont été standardisés, ainsi l'ajout de 25 µg/ml de G6P permet d'augmenter la sensibilité des souches à l'antibiotique en activant l'expression des transporteurs UhpT. Sur MH seulement, *E. coli* montre une grande résistance à l'antibiotique (Barry *et al.*, 1991, Grimm, 1979). L'utilisation du G6P est dû au fait que son transporteur est prédominant dans l'internalisation de la fosfomycine, car l'ajout de G6P dans le milieu augmente la sensibilité de manière significative par rapport à l'ajout de G3P dans le milieu (Frederick M. Kahan *et al.*, 1974).

Nous avons donc utilisé du MH-G6P, LB-G6P ainsi que l'urine de femme comme milieu de culture. Nous avons déterminé les CFU des souches testées sur les milieux de croissance employés sans fosfomycine, dans les mêmes conditions de croissance que celles utilisées lors de tests (voir Figure 3.5). Les CFU obtenues, selon la souche, sont identiques sur tous les milieux. Cela indique que le milieu en lui seul n'influe pas sur la quantité de CFU. Les résultats que nous avons obtenus sont similaires aux FM déterminées lors d'études déjà effectuées. Malgré des concentrations de fosfomycine différentes utilisées lors de ces études et la nôtre, les FM demeurent entre 10^{-7} et 10^{-8} en milieu MH-G6P et entre 10^{-3} et 10^{-4} sur MH. La revue présentée par Karageorgopoulos *et al.*, 2012, présente les différentes FM déterminées par plusieurs équipes de chercheurs à ce jour. L'intérêt de nos résultats vient du fait que nous avons déterminé les FM en urine et milieu riche avec ou sans G6P, et ce, pendant différentes phases de croissance. La FM n'a pas pu être déterminée sur MH et LB lors de la phase stationnaire, aux concentrations utilisées, car il n'y a eu aucune inhibition de croissance. En revanche nous avons pu déterminer une FM sur ces mêmes milieux et aux mêmes concentrations de fosfomycine, lors de la phase

exponentielle de croissance, car il y a eu une diminution des CFU en présence de l'antibiotique. Cela signifie que la sensibilité à la fosfomycine des souches testées dépend de la phase de croissance. La détermination de la sensibilité à la fosfomycine se fait généralement en utilisant des bactéries en phase stationnaire, ce qui explique qu'il ait été nécessaire de compléter le milieu avec du G6P afin d'augmenter leur sensibilité (CLSI, 2012, Kahlmeter *et al.*, 2012). Selon nos résultats, on peut en déduire également que l'ajout de G6P dans le milieu n'est pas nécessaire lorsque les bactéries sont en phase exponentielle de croissance, car leur sensibilité à la fosfomycine est augmentée. Cela pourrait permettre d'expliquer le faible taux de résistance observé en clinique. Lors d'une ITU, pour pouvoir infecter les bactéries doivent se multiplier et donc entrer en phase de croissance exponentielle, où elles sont plus sensibles à la fosfomycine.

Un fait notable est qu'il y a une différence significative entre les FM obtenues sur MH et LB en phase exponentielle et celles obtenues sur MH-G6P, LB-G6P et urine en phase exponentielle et stationnaire de croissance (voir Figure 3.6). La FM est plus faible en urine qu'en MH et LB. Il y a donc moins de mutants résistants qui surviennent en urine qu'en milieu riche. On peut en déduire qu'en phase exponentielle les transporteurs UhpT et GlpT sont plus exprimés qu'en phase stationnaire, expliquant la sensibilité accrue à la fosfomycine lors de cette phase de croissance. De plus, il n'y a pas de différence significative entre les FM obtenues sur LB-G6P, MH-G6P et urine, quelque soit la phase de croissance des bactéries. On sait que le G6P est ajouté pour permettre l'expression des transporteurs UhpT et augmenter la sensibilité des souches à la fosfomycine, alors on peut supposer que l'urine permet l'expression des transporteurs en phase stationnaire et en phase exponentielle de croissance. Ces résultats peuvent également supporter l'hypothèse de l'existence des autres transporteurs de la fosfomycine, exprimés en urine et pas en milieu MH ou LB. Le milieu de culture, le stade de croissance des UPEC affectent la FM de résistance à la fosfomycine.

L'étude transcriptomique réalisée par Snyder *et al.*, 2004 a permis d'observer l'expression de différents gènes en urine et LB durant la phase de croissance de CFT073. Sur le même modèle, il serait intéressant de se concentrer sur l'expression des transporteurs GlpT et UhpT durant les phases de croissance exponentielle et stationnaire. Différentes conditions devraient être considérées à de fins de comparaison, telle la présence/absence de G6P dans le milieu urine versus MH (milieux de routine pour l'étude de la sensibilité aux antibiotiques).

4.6 Caractérisation des mutants spontanés

Selon le gène muté, les mutations qui mènent à la résistance à la fosfomycine modifient la capacité des souches à métaboliser certains sucres. Ainsi la capacité d'utilisation des sucres chez les mutants spontanés nous permet de cibler les gènes potentiellement mutés, de les faire séquencer et de déterminer le taux d'apparition des différents types de mutations chez ces mutants isolés.

4.6.1 Détermination des gènes potentiellement mutés

Selon les résultats du Tableau 3.3, nous constatons que dans notre échantillon les mutations affectant les gènes des transporteurs UhpT et GlpT surviennent en milieu riche chez 73,6 % des clones testés, contre aucun en urine. La majorité des clones sélectionnés en urine, 68 %, semblent avoir des mutations au niveau des gènes régulateurs *cyaA* et *ptsI*. Ainsi, nous pouvons déduire que les mutations affectant les régulateurs de l'AMPc surviennent plus souvent en urine qu'en LB ou MH. L'équipe de Nilsson *et al.*, 2003 a recensé des mutations de résistance à la fosfomycine chez des souches UPEC provenant de cas cliniques et celles provenant de mutants de laboratoire. Ils n'ont constaté aucune mutation affectant les gènes *ptsI* et *cyaA* chez les mutants provenant de souches cliniques contrairement à ceux de laboratoire. Ils ont proposé l'hypothèse selon laquelle l'absence de mutation dans les gènes *ptsI* et *cyaA*, recensées chez les mutants cliniques, serait due à l'incapacité de ces mutants à persister dans le tractus urinaire, et non à l'absence d'apparition de ces mutations. Nous pouvons constater que nos résultats soutiennent cette hypothèse, en montrant que les mutations affectant les gènes *ptsI* et *cyaA* surviennent plus fréquemment en urine qu'en LB ou MH (Tableau 3.3), et que le double CFT073 $\Delta uhpT\Delta glpT$ peut persister autant que les souches sauvages dans le tractus urinaire de souris lors de la coinfection dans le modèle murin (Figure 3.4), de même que pour le test d'agglutination sur levure (Figure 3.3).

Tel que mentionné précédemment, l'urine est un milieu acide et limité en nutriments. Ainsi, pour y survivre, la bactérie doit solliciter des systèmes lui permettant de résister au stress, au milieu acide et d'utiliser des sources de carbone alternatives. L'AMPc synthétisée par le gène *cyaA* de

l'adénylate cyclase et le système Pts, incluant le gène *ptsI*, en font partie (voir section 1.8.1 et 1.8.4). Nous pouvons donc expliquer le fort taux d'apparition de mutation dans ces systèmes par le fait qu'ils y sont plus exprimés qu'en milieu urine. Nous pouvons supposer qu'ils seront mutés en premier en urine. 32 % des mutants sélectionnés en urine sont porteurs de mutations non identifiées par la méthode utilisée. Nous soupçonnons que les mutations survenues pourraient affecter le gène essentiel *murA*, dont la protéine est la cible de la fosfomycine. Le gène *murA* code pour la protéine MurA, nécessaire à la synthèse de la paroi bactérienne, et essentielle pour la viabilité et la survie cellulaire. Ainsi chez un clone viable, certaines mutations dans la séquence du gène *murA* n'affectent pas le fonctionnement de la protéine MurA, ni la croissance de la bactérie (Baum *et al.*, 2001, Brown *et al.*, 1995).

Pour poursuivre ce projet en lien avec les tests en levure (Figure 3.3), les tests de coinfection (Figure 3.4) et l'importance de ces gènes pour la virulence bactérienne, il serait intéressant de tester dans un modèle murin d'infection ascendante du tractus urinaire, la capacité d'infection des souches UPEC délétées des gènes *ptsI* et *cyaA*.

4.6.2 Séquençage des gènes potentiellement mutés sélectionnés

Les résultats du séquençage des gènes sont présentés dans le Tableau 3.4. Chez les mutants MSLB536₂₁, MSLB536₁₆, MSLB72₅, MSLB73₁₈ et MSUrExMG₁₁ les mutations observées dans le gène *glpT* séquencé, aboutissent au remplacement de l'acide glutamique par une lysine, en position 448 dans la séquence protéique. Ces mutations n'affectent pas les acides aminés impliqués dans le site actif et la formation du pore central. Elles se trouvent au niveau de l'hélice H12 qui constitue les bords extérieurs de la protéine et n'est pas impliquée dans la formation du pore (Huang *et al.*, 2003). Nous pouvons supposer que cette mutation ne devrait pas affecter la liaison au substrat ni son transport. Cependant, elle pourrait influencer sur d'autres aspects du fonctionnement du transporteur comme sa vitesse ou les changements de conformation.

Les mutations observées dans le gène *glpT* chez les mutants MSLB73₁₄, dans le gène *uhpT* chez les mutants MSLB536₁, ainsi que dans le gène *cyaA* chez les mutants MSUr536₁ et MSUr73₂ mènent à la formation d'un codon stop prématuré. Pour le transporteur GlpT, on passe d'une protéine normale de 452aa, à une protéine mutante de 89aa. Pour le transporteur UhpT, la

protéine normale est composée de 463aa et la protéine mutée est composée de 83aa. Pour l'adénylate cyclase, on passe d'une protéine de 2755aa à des protéines mutantes de 744aa et 234aa. Chez les mutants MSG6P72₁ et MSG6P72₅ il y a une grande délétion du gène *uhpT*, aboutissant à une séquence peptidique de 13aa. Ces modifications aboutissent à des protéines tronquées non fonctionnelles, et donc incapables de transporter la fosfomycine dans la cellule.

Chez les mutants MSLB73₉ et MSLB73₄, les mutations observées dans le gène *uhpT* concernent le remplacement d'une glutamine par une proline en position 30 et d'une valine par une leucine en position 295. Ces mutations se trouvent respectivement au niveau des hélices H1 et H7 de la protéine, qui composent la partie centrale et la périphérie du transporteur. Elles ne concernent pas les résidus identifiés comme essentiels pour la reconnaissance et le transport du substrat (A D Lloyd and R J Kadner, 1990, Lemieux *et al.*, 2004). Néanmoins leur position dans le pore suggère que ces modifications peuvent affecter son fonctionnement et empêcher le transport correct du substrat.

Les modifications aboutissant à des protéines tronquées indiquent clairement une incapacité des transporteurs à internaliser la fosfomycine. En ce qui concerne les remplacements d'acides aminés, il serait intéressant, en continuité de ces résultats, d'effectuer une mutagenèse dirigée aux sites de mutation, afin de vérifier de quelle façon elles influent sur le fonctionnement de ces transporteurs.

Pour certains gènes *uhpT* séquencés (chez les mutants MSUrMG₁₁, MSLBMG₂₃ et MSUr725) ainsi que pour tous les gènes *ptsI* et *murA* séquencés, aucune mutation n'a été observée. Cependant, cela ne signifie pas qu'il n'y a pas de mutation au niveau d'autres gènes impliqués dans les systèmes de régulation dont font partie les gènes étudiés. Il a été montré que le gène régulateur *uhpA*, régulant l'expression de *uhpT*, peut être muté (Nilsson *et al.*, 2003). Le gène *murA* est un gène essentiel, et donc, une mutation ne peut pas inactiver sa fonction sous peine d'altérer la viabilité cellulaire. Cependant, il a été démontré qu'une surexpression de ce gène amène à la résistance à la fosfomycine (voir section 1.8.5). Ainsi, on peut supposer que ce gène est possiblement surexprimé chez les mutants MSUr536₄, MSUr74₄, MSUr72₁, et MSUrMG₁. Cela ouvre donc la voie à d'autres investigations plus poussées. Il serait intéressant pour la suite, de vérifier les séquences des autres gènes impliqués dans la régulation de ces différents systèmes, chez les mutants dont les gènes séquencés ne révèlent aucune mutation. Par exemple,

on pourrait s'intéresser au gène *gplR*, régulateur négatif de *gplT*, ou encore aux gènes des enzymes EI ou EII impliquées dans la cascade de phosphorylation dans le système PTS (voir section 1.8.1 et 1.8.2).

Conclusion

Les bactéries *Escherichia coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables de plus de 90 % des infections du tractus urinaire (ITU), mais l'augmentation des résistances aux antibiotiques pose des problèmes de traitement. Néanmoins, malgré l'utilisation fréquente de l'antibiotique fosfomycine en Europe depuis plus de 20 ans, seulement 3 % des souches isolées en clinique sont porteuses de mutations de résistance. Cela est l'une des raisons pour lesquelles on s'intéresse à cet antibiotique. Cette molécule représente un traitement idéal de première ligne contre les ITU. En contradiction avec ces données, la fréquence de génération de mutations spontanées de résistance à la fosfomycine demeure très élevée en laboratoire. Cette observation a fait que l'utilisation de la fosfomycine comme traitement des ITU communautaires est restée presque inexistante en Amérique du Nord jusqu'à ces 4 dernières années. Ainsi, au cours de cette étude nous nous sommes évertués à proposer une explication à la contradiction entre les observations *in vivo* et celles *in vitro*. L'hypothèse émise par la communauté scientifique propose que les mutations de résistance survenant *in vivo* affectent le coût biologique des bactéries et diminuent leur capacité à persister dans le système urinaire. Lors de ce travail, nous avons donc utilisé les souches UPEC : 536, CFT073, ECOR72 et la souche de laboratoire K-12, MG1655. Nous avons également utilisé leurs mutants respectifs, délétés des gènes connus pour amener une résistance à la fosfomycine : *uhpT*, *glpT*, *ptsI*, et *cyaA*.

Nous avons atteint nos différents objectifs au cours de cette étude. Nous avons montré que les mutations $\Delta ptsI$ et $\Delta cyaA$ diminuent la production du fimbriae type 1, nécessaire à la colonisation de la vessie; tandis que les mutations $\Delta glpT$ et $\Delta uhpT$ n'influencent pas la production de ce fimbriae et que les gènes *glpT* et *uhpT* ne semblent pas essentiels lors d'une ITU. Nous avons montré que la fréquence de mutations spontanées dépend d'une combinaison de facteurs soit le milieu de culture et la phase de croissance des bactéries. Grâce au séquençage, nous avons pu déterminer le type de mutations survenues dans les gènes mutés, chez des mutants spontanés. Plusieurs conclusions peuvent être retenues de ce travail, permettant de mieux comprendre les différences observées entre *in vivo* et *in vitro* et confortant l'hypothèse suggérée. Nous avons démontré que la fréquence de génération de mutants spontanés est plus faible en urine qu'en

milieu LB ou Mueller-Hinton (MH), car l'urine limite l'apparition de mutants spontanés de résistance à la fosfomycine. Ce résultat apporte une explication à la différence de fréquence de mutation entre *in vivo* et *in vitro*. Nous n'avons observé aucune mutation affectant les gènes des transporteurs *glpT* et *uhpT* en urine. Inversement, des mutations affectant les gènes impliqués dans la virulence des *E. coli*, *ptsI* et *cyaA*, surviennent dans plus de la moitié de notre échantillon de mutants sélectionnés en urine. De plus, nous avons montré que les souches porteuses de mutations de résistance ciblées restent sensibles à la fosfomycine et que les concentrations retrouvées dans l'urine lors d'un traitement sont létales pour les UPEC testées. Ces résultats soutiennent l'hypothèse que les mutants de résistance survenant *in vivo* ont une capacité diminuée à persister dans le tractus urinaire lors du traitement.

Ce travail apporte donc quelques éléments de réponses concernant la fréquence de mutation de résistance à la fosfomycine observée *in vivo* soit beaucoup plus faible que celle observée *in vitro*. Nous proposons une nouvelle hypothèse, ouvrant la voie à de futures investigations. Nous suggérons qu'il y a un transporteur supplémentaire pour la fosfomycine qui serait exprimé en urine, augmentant la sensibilité des souches *in vivo*. De plus, diverses interrogations demeurent en suspens. Il serait intéressant de vérifier dans un modèle murin d'infection ascendante du tractus urinaire, la capacité d'infection des mutants $\Delta ptsI$ et $\Delta cyaA$; ou encore de vérifier si les régulateurs des systèmes impliqués dans la résistance à la fosfomycine comportent des mutations chez les mutants résistants spontanés.

Références

- Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A & Carniel E (1999) *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96(24):14043-14048.
- Aiba H, Nakamura T, Mitani H & Mori H (1985) Mutations that alter the allosteric nature of cAMP receptor protein of *Escherichia coli*. *The EMBO journal* 4(12):3329.
- Aldea M, Garrido T, Hernandez-Chico C, Vicente M & Kushner S (1989) Induction of a growth-phase-dependent promoter triggers transcription of *bolA*, an *Escherichia coli* morphogene. *The EMBO journal* 8(12):3923.
- Andrews, Baquero F, Beltran J, Canton E, Crokaert F, Gobernado M, Gomez-Lus R, Loza E, Navarro M & Olay T (1983) International collaborative study on standardization of bacterial sensitivity to fosfomycin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 12(4):357-361.
- Andrews SC, Robinson AK & Rodríguez-Quiñones F (2003) Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* 27(2-3):215-237.
- Barry AL & Fuchs PC (1991) In vitro susceptibility testing procedures for fosfomycin tromethamine. *Antimicrob Agents Chemother* 35(6):1235-1238.
- Barton L (2005) *Structural and Functional Relationships in Prokaryotes*. Springer. <http://books.google.ca/books?id=10XATRApIAMC>
- Battesti A, Majdalani N & Gottesman S (2011) The RpoS-mediated general stress response in *Escherichia coli**. *Annual review of microbiology* 65:189-213.
- Bauer RJ, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen ME, Saxen H & Marrs CF (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):1521-1524.
- Baum EZ, Montenegro DA, Licata L, Turchi I, Webb GC, Foleno BD & Bush K (2001) Identification and characterization of new inhibitors of the *Escherichia coli* MurA enzyme. *Antimicrob Agents Chemother* 45(11):3182-3188.
- Bélanger L, Garenaux A, Harel J, Boulianne M, Nadeau E & Dozois CM (2011) *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS immunology and medical microbiology* 62(1):1-10.
- Berg HC (2004) *E. coli in Motion*. Springer. <http://books.google.ca/books?id=qyVoI1iUiBkC>
- Berger CN, Billker O, Meyer TF, Servin AL & Kansau I (2004) Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Molecular microbiology* 52(4):963-983.

- Bergsten. G, Björn Wullta & Svanborg C (2005) *Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract. *Microbiology* 295(6-7):487-502.
- Bergthorsson U & Ochman H (1998) Distribution of chromosome length variation in natural isolates of *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 15(1):6-16.
- Beutin L (1991) The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* 180(4):167-182.
- Blattner FR, Plunkett G, Bloch CA, Perna NT, Burland V, Riley M, Collado-Vides J, Glasner JD, Rode CK, Mayhew GF, Gregor J, Davis NW, Kirkpatrick HA, Goeden MA, Rose DJ, Mau B & Shao Y (1997) The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277(5331):1453-1462.
- Boles E & Krämer R (2004) *Molecular Mechanisms Controlling Transmembrane Transport*. Springer. <http://books.google.ca/books?id=90M73Jd3HVQC>
- Brooks T & Keevil C (1997) A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Letters in applied microbiology* 24(3):203-206.
- Brown ED, Vivas EI, Walsh CT & Kolter R (1995) MurA (MurZ), the enzyme that catalyzes the first committed step in peptidoglycan biosynthesis, is essential in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 177(14):4194-4197.
- Bruyère F, Bugel H, Cariou G, Boiteux J-P, Hoznek A, Mignard J-P, Escaravage L, Bernard L, Sotto A & Soussy C-J (2009) Recommandations du comité d'infectiologie de l'AFU: diagnostic, traitement et suivi des infections communautaires bactériennes de l'appareil urinaire de l'homme et de la femme adultes: cystites aiguës. *Pelvi-périnéologie* 4(4):304-308.
- Brzuszkiewicz E, Bruggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Olschlager T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emody L, Gottschalk G, Hacker J & Dobrindt U (2006) How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(34):12879-12884.
- Cairns & Foster (1991) Adaptive Reversion of a Frameshift Mutation in *Escherichia coli*. *Genetics Society of America*
- Caprioli A, Falbo V, Roda LG, Ruggeri FM & Zona C (1983) Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infection and Immunity* 39(3):1300-1306.
- Castañeda-García A, Rodríguez-Rojas A, Guelfo JR & Blázquez J (2009) The glycerol-3-phosphate permease GlpT is the only fosfomycin transporter in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Bacteriology* 191(22):6968-6974.
- Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, Blasiar D, Bieri T, Meyer RR, Ozersky P, Armstrong JR, Fulton RS, Latreille JP, Spieth J, Hooton TM, Mardis ER, Hultgren SJ & Gordon JI (2006) Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103(15):5977-5982.

- CLSI (2012) Twenty-second information supplement. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing* 33(3):M100-S122 replace M100-S121.
- CLSI & Institute CaLS (2013) M100-S23, Twenty-Third Information Supplement. *Performance Standards for antimicrobial Susceptibility Testing*
- Crépin S, Harel J & Dozois CM (2012a) Chromosomal complementation using tn7 transposon vectors in enterobacteriaceae. *Applied and environmental microbiology* 78(17):6001-6008.
- Crépin S, Houle S, Charbonneau M-È, Mourez M, Harel J & Dozois CM (2012 b) Decreased expression of type 1 fimbriae by a pst mutant of uropathogenic *Escherichia coli* reduces urinary tract infection. *Infection and Immunity* 80(8):2802-2815.
- Crosa, Mey & Payne (2004) *Iron transport in bacteria*. ASM Press, Washinton DC
- Cueto D, L. L, R. HJ, C. M & A. P (2006) In vitro activity of fosfomycin against extended-spectrum-beta-lactamase-producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae*: comparison of susceptibility testing procedures. *Antimicrob Agents Chemother* 50(1):368-370.
- Curtiss R & Kelly SM (1987) *Salmonella Typhimurium* deletion mutants lacking adenylate cyclase and cyclic AMP receptor protein are avirulent and immunogenic. *Infection and Immunity* 55(12):3035-3043.
- Czirok E, Orskov I & Orskov F (1982) O: K: H: F serotypes of fimbriated *Escherichia coli* strains isolated from infants with diarrhea. *Infection and Immunity* 37(2):519-525.
- Datsenko KA & Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci USA* 97(12):6640-6645.
- Davis JM, Carvalho HM, Rasmussen SB & O'Brien AD (2006) Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infection and Immunity* 74(8):4401-4408.
- Davis JM, Rasmussen SB & O'Brien AD (2005) Cytotoxic necrotizing factor type 1 production by uropathogenic *Escherichia coli* modulates polymorphonuclear leukocyte function. *Infection and Immunity* 73(9):5301-5310.
- De Reuse H & Danchin A (1988) The ptsH, ptsI, and crr genes of the *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: a complex operon with several modes of transcription. *Journal of bacteriology* 170(9):3827-3837.
- Dho-Moulin M & Fairbrother JM (1999) Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* 30(2-3):299-316.
- Donnenberg M (2013) *Escherichia coli: Pathotypes and Principles of Pathogenesis*. Elsevier Science. http://books.google.ca/books?id=wcvvJFj_hPwC
- Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clément R, Buisson-Touati C, Flatau G, Gagnoux L, Piechaczyk M, Boquet P & Lemichez E (2002) CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome

- machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 111(4):553-564.
- Dozois & Curtiss (1999) Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Veterinary research* 30(2-3):157-179.
- Dozois, Daigle & Curtiss (2003) Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100(1):247-252.
- Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C & Curtiss R (2000) Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and Immunity* 68(7):4145-4154.
- El Zoeiby A, Sanschagrin F & Levesque RC (2003) Structure and function of the Mur enzymes: development of novel inhibitors. *Molecular microbiology* 47(1):1-12.
- Ericsson CD, DuPont HL & Steffen R (2007) *Travelers' Diarrhea*. BC Decker. <http://books.google.ca/books?id=7knxQN8E8VgC>
- EUCAST & Testing ECoAS (2013) Breakpoint Table, *Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters* Version 3.
- Falagas ME, Kastoris AC, Kapaskelis AM & Karageorgopoulos DE (2010) Fosfomycin for the treatment of multidrug-resistant, including extended-spectrum β -lactamase producing, Enterobacteriaceae infections: a systematic review. *The Lancet infectious diseases* 10(1):43-50.
- Falbo V, Pace T, Picci L, Pizzi E & Caprioli A (1993) Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 61(11):4909-4914.
- Fann M-C, Busch A & Maloney PC (2003) Functional characterization of cysteine residues in GlpT, the glycerol 3-phosphate transporter of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 185(13):3863-3870.
- Faraldo-Gómez JD & Sansom MSP (2003) Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4(2):105-116.
- FDA & Administration FaD (2011) Monurol. *Monurol-draft-labeling-text-track* Reference ID: 2 930 481.
- Francino MP (2012) *Horizontal Gene Transfer in Microorganisms*. Caister Academic Press. <http://books.google.ca/books?id=Wohb0ThFvGUC>
- Frederick M. Kahan, Jean S. Kahan, Patrick J. Cassidy & Kropp H (1974) The mechanism of action of fosfomycin. *Annals of the New York Academy of Sciences* 235(0):364-386.
- Garénaux A, Caza M & Dozois CM (2011) The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Veterinary Microbiology* 153(1-2):89-98.

- Goetz DH, Holmes MA, Borregaard N, Bluhm ME, Raymond KN & Strong RK (2002) The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* 10(5):1033-1043.
- Greenwood D, Coyle S & Andrew J (1987) The trometamol salt of fosfomycin: microbiological evaluation. *European urology* 13 Suppl 1:69-75.
- Grimm H (1979) In vitro investigations with fosfomycin on Mueller-Hinton agar with and without glucose-6-phosphate. *Infection* 7(5):256-259.
- Guinote IB & Freire P (2012) Characterization of the BOLA homolog IbaG: a new gene involved in acid resistance. *Journal of microbiology and biotechnology* 22(4):484-493.
- Gupta K, Hooton TM, Naber KG, Wullt B, Colgan R, Miller LG, Moran GJ, Nicolle LE, Raz R, Schaeffer AJ & Soper DE (2011) International clinical practice guidelines for the treatment of acute uncomplicated cystitis and pyelonephritis in women: A 2010 update by the Infectious Diseases Society of America and the European Society for Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Infect Dis* 52(5):e103-120.
- Guyer, Henderson IR, Nataro JP & Mobley HL (2000) Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 38(1):53-66.
- Guyer, Radulovic S, Jones F-E & Mobley HLT (2002) Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infection and Immunity* 70(8):4539-4546.
- Hacker J & Kaper JB (2000) Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* 54:641-679.
- Hagberg L, Engberg I, Freter R, Lam J, Olling S & Eden CS (1983) Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infection and Immunity* 40(1):273-283.
- Haldimann A & Wanner BL (2001) Conditional-replication, integration, excision, and retrieval plasmid-host systems for gene structure-function studies of bacteria. *Journal of Bacteriology* 183(21):6384-6393.
- Hall JA (1999) Altered Substrate Selectivity in a Mutant of an Intrahelical Salt Bridge in UhpT, the Sugar Phosphate Carrier of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 274(10):6148-6153.
- Hancock V, Ferrières L & Klemm P (2008) The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology (Reading, Engl)* 154(Pt 1):167-175.
- Heesemann J, Hantke K, Vocke T, Saken E, Rakin A, Stojiljkovic I & Berner R (1993) Virulence of *Yersinia enterocolitica* is closely associated with siderophore production, expression of an iron-repressible outer membrane polypeptide of 65,000 Da and pesticin sensitivity. *Molecular microbiology* 8(2):397-408.
- Henderson IR, Fernando Navarro-Garciab & James P Nataroa (1998) The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *trends Microbiology* 6(9):370-378.

- Henderson IR, Navarro-Garcia F, Desvaux M, Fernandez RC & Ala'Aldeen D (2004) Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* 68(4):692-744.
- Hendlin D, Stapley, & E. O. J, M., Wallick, H., Miller, A. K., Wolf, F. J., ...T. W. Miller, L. Chaiet, F. M. Kahan, E. L. Foltz, H. B. Woodruff, J. M. Mata, S. Hernandez, S. Mochales (1969) Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of *Streptomyces*. *Science* 166((3901)):122-123.
- Herzer PJ, Inouye S, Inouye M & Whittam TS (1990) Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 172(11):6175-6181.
- Hori N, Nagasawa K, Shimizu T & Nakata T (1999) Efficient synthesis of 2, 3-trans-tetrahydropyrans and oxepanes: Rearrangement-ring expansion of cyclic ethers having a chloromethanesulfonate. *Tetrahedron letters* 40(11):2145-2148.
- Huang Y, Lemieux MJ, Song J, Auer M & Wang DN (2003) Structure and mechanism of the glycerol-3-phosphate transporter from *Escherichia coli*. *Science* 301(5633):616-620.
- Hull RA & Hull SI (1997) Nutritional requirements for growth of uropathogenic *Escherichia coli* in human urine. *Infection and Immunity* 65(5):1960-1961.
- Hultgren SJ, Normark S & Abraham SN (1991) Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu Rev Microbiol* 45:383-415.
- Hung C-S, Dodson KW & Hultgren SJ (2009) A murine model of urinary tract infection. *Nature protocols* 4(8):1230-1243.
- Institut-de-l'élevage (2008) *Maladies des Bovins*. Editions France Agricole. <http://books.google.ca/books?id=3LMi05CpbSwC>
- Jaureguy F (2009) Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections. *Medecine Sciences* 25(3):221-223.
- Johnson & Russell RG (1996) Diagnosis and treatment of uncomplicated urinary tract infection. *Infectious disease clinics of North America*:377-403.
- Johnson JR (1991) Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 4(1):80-128.
- Johnson JR, O'Bryan TT, Kuskowski M & Maslow JN (2001) Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infection and Immunity* 69(9):5363-5374.
- Kadner, J R, Webber CA & Island MD (1993) The family of organo-phosphate transport proteins includes a transmembrane regulatory protein. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 25(6):637-645.
- Kadner ADLaRJ (1990) Topology of the *Escherichia coli* uhpT sugar-phosphate transporter analyzed by using TnpHoA fusions. *Journal of Bactériology* 174(4):1688.
- Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ & Kropp H (1974) The mechanism of action of fosfomycin (phosphonomycin). *Annals of the New York Academy of Sciences* 235(1):364-386.

- Kahlmeter G & Poulsen HO (2012) Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* from community-acquired urinary tract infections in Europe: the ECO.SENS study revisited. *Int J Antimicrob Agents* 39(1):45-51.
- Kaper JB, Nataro JP & Mobley HL (2004) Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology* 2(2):123-140.
- Karageorgopoulos DE, Wang R, Yu XH & Falagas ME (2012) Fosfomycin: evaluation of the published evidence on the emergence of antimicrobial resistance in Gram-negative pathogens. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 67(2):255-268.
- Kisielius P, Schwan W, Amundsen S, Duncan J & Schaeffer A (1989) In vivo expression and variation of *Escherichia coli* type 1 and P pili in the urine of adults with acute urinary tract infections. *Infection and Immunity* 57(6):1656-1662.
- Knottnerus BJ, Nys S, Ter Riet G, Donker G, Geerlings SE & Stobberingh E (2008) Fosfomycin tromethamine as second agent for the treatment of acute, uncomplicated urinary tract infections in adult female patients in The Netherlands? *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 62(2):356-359.
- Kok M, Bron G, Erni B & Mukhija S (2003) Effect of enzyme I of the bacterial phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system (PTS) on virulence in a murine model. *Microbiology* 149(9):2645-2652.
- Korhonen TK (1979) Yest cell agglutination by purified enterobacteriaial pili. *PEMS Microbiology* (6):421-426.
- La Ragione RM & Woodward MJ (2002) Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* 73(1):27-35.
- Lane MC, Lockatell V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, Johnson DE & Mobley HLT (2005) Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infection and Immunity* 73(11):7644-7656.
- Lawrence JG & Ochman H (1997) Amelioration of bacterial genomes: rates of change and exchange. *J Mol Evol* 44(4):383-397.
- Lawrence JG & Ochman H (1998) Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 95(16):9413-9417.
- Lemieux, Huang Y & Wangl DN (2005) Crystal structure and mechanism of GlpT, the glycerol-3-phosphate transporter from *E. coli*. *J Electron Microsc* 54(1):43-44.
- Lemieux, Huang Y & Wang DN (2004) Glycerol-3-phosphate transporter of *Escherichia coli*: structure, function and regulation. *Research in microbiology* 155(8):623-629.
- Lemonnier M, Landraud L & Lemichez E (2007) Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiology Reviews* 31(5):515-534.
- Lin H, Fischbach MA, Liu DR & Walsh CT (2005) In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc* 127(31):11075-11084.

- Lobel B & Soussy C (2007) *Les infections urinaires*. Springer. <http://books.google.ca/books?id=N3p0jLWLObsC>
- Loewen PC, Hu B, Strutinsky J & Sparling R (1998) Regulation in the rpoS regulon of *Escherichia coli*. *Canadian journal of microbiology* 44(8):707-717.
- Macnab RM (2003) How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* 57:77-100.
- Maegawa S, Ito K & Akiyama Y (2005) Proteolytic action of GlpG, a rhomboid protease in the *Escherichia coli* cytoplasmic membrane. *Biochemistry* 44(41):13543-13552.
- Mahillon J, Léonard C & Chandler M (1999) IS elements as constituents of bacterial genomes. *Res Microbiol* 150(9-10):675-687.
- Marchese A, Gualco L, Debbia EA, Schito GC & Schito AM (2003) In vitro activity of fosfomycin against Gram-negative urinary pathogens and the biological cost of fosfomycin resistance. *Int J Antimicrob Agents* 22, Supplement 2(0):53-59.
- Maroncle NM, Sivick KE, Brady R, Stokes F-E & Mobley HLT (2006) Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 74(11):6124-6134.
- Mirelman D, Altmann G & Eshdat Y (1980) Screening of Bacterial Isolates for Mannose-Specific Lectin Activity by Agglutination of Yeasts. *Journal of clinical microbiology* 11(4):238.
- Mobley HLT, Donnenberg MS & Hagan EC (2009) Uropathogenic *Escherichia coli*. in *EcoSal - Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology* (ASM Press, Washington, DC).
- Montgomerie JZ, Bindereif A, Neilands JB, Kalmanson GM & Guze LB (1984) Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infection and Immunity* 46(3):835-838.
- Müller CM, Åberg A, Strasevičiene J, Emödy L, Uhlin BE & Balsalobre C (2009) Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS pathogens* 5(2):e1000303.
- Mulvey (2002) Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 4(5):257-271.
- Mulvey, Lopez-Boado YS, Wilson CL, Roth R, Parks WC, Heuser J & Hultgren SJ (1998) Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 282(5393):1494-1497.
- Nanninga N (1998) Morphogenesis of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(1):110-129.
- Neogen_corp. (3 june 2011) Muerller-Hinton agard (7101). *PI 7101 Rev*.
- Nicolle LE (2011) Update in adult urinary tract infection. *Current infectious disease reports* 13(6):552-560.
- Nilsson AI, Berg OG, Aspevall O, Kahlmeter G & Andersson DI (2003) Biological Costs and Mechanisms of Fosfomycin Resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47(9):2850-2858.

- Notley-McRobb L, King T & Ferenci T (2002) rpoS mutations and loss of general stress resistance in *Escherichia coli* populations as a consequence of conflict between competing stress responses. *Journal of Bacteriology* 184(3):806-811.
- Nowicki B (1996) In vitro models for the study of uropathogens. *Urinary Tract Infections. HLT Mobley and JW Warren, editors. ASM Press, Washington, DC:341-376.*
- Ochman H & Selander RK (1984) Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *Journal of bacteriology* 157(2):690-693.
- Orskov I, Orskov F, Birch-Andersen A, Kanamori M & Svanborg-Eden C (1981) O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. *Scandinavian journal of infectious diseases. Supplementum* 33:18-25.
- Palaniappan RU, Zhang Y, Chiu D, Torres A, Debroy C, Whittam TS & Chang YF (2006) Differentiation of *Escherichia coli* pathotypes by oligonucleotide spotted array. *Journal of clinical microbiology* 44(4):1495-1501.
- Pao SS, Paulsen IT & Saier MH (1998) Major facilitator superfamily. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 62(1):1-34.
- Parreira VR & Gyles CL (2003) A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and Immunity* 71(9):5087-5096.
- Patel SS, Balfour JA & Bryson HM (1997) Fosfomycin tromethamine. *Drugs* 53(4):637-656.
- Peter & Craig (2001) Tn7: smarter than we thought - review. *Macmillan Magazines Ltd* 2.
- Pharma-Direct (2012) Fosfomycine au canada disponibilité.pdf. *Pharma Direct Nouvelles* 24 oct. 12:pages 1/3.
- Plumbridge J (2002) Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli* : the role and interactions of Mlc. *Current opinion in microbiology* 5(2):187-193.
- Popovic M, Steinort D, Pillai S & Joukhadar C (2010) Fosfomycin: an old, new friend. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases : official publication of the European Society of Clinical Microbiology* 29(2):127-142.
- Porter CJ, Bantwal R, Bannam TL, Rosado CJ, Pearce MC, Adams V, Lyras D, Whisstock JC & Rood JI (2012) The conjugation protein TcpC from *Clostridium perfringens* is structurally related to the type IV secretion system protein VirB8 from Gram-negative bacteria. *Molecular microbiology* 83(2):275-288.
- Provence D & Curtiss R (1992) Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infection and Immunity* 60(11):4460-4467.
- Purich DL & Allison RD (2003) *The enzyme reference: a comprehensive guidebook to enzyme nomenclature, reactions, and methods.* Access Online via Elsevier,
- Ray WK, Zeng G, Potters MB, Mansuri AM & Larson TJ (2000) Characterization of a 12-Kilodalton Rhodanese Encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and Its Interaction with Thioredoxin. *Journal of Bacteriology* 182(8):2277-2284.

- Reddy P & Kamireddi M (1998) Modulation of *Escherichia coli* adenylyl cyclase activity by catalytic-site mutants of protein IIAGlc of the phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system. *Journal of Bacteriology* 180(3):732-736.
- Reddy P, Miller D & Peterkofsky A (1986) Stimulation of *Escherichia coli* adenylyl cyclase activity by elongation factor Tu, a GTP-binding protein essential for protein synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 261(25):11448-11451.
- Rodríguez-Rojas A, Maciá MD, Couce A, Gómez C, Castañeda-García A, Oliver A & Blázquez J (2010) Assessing the emergence of resistance: the absence of biological cost in vivo may compromise fosfomycin treatments for *P. aeruginosa* infections. *PLoS ONE* 5(4):e10193.
- Ronald LS (2008) *Analysis of Pathoadaptive Mutations in Escherichia coli*. ProQuest, University of Washington. <http://books.google.ca/books?id=CIJiSLhwkOMC>
- Roos V, Nielsen EM & Klemm P (2006a) Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesins, growth and competition. *FEMS Microbiol Lett* 262(1):22-30.
- Roos V, Schembri MA, Ulett GC & Klemm P (2006b) Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 carries mutations in the *foc* locus and is unable to express F1C fimbriae. *Microbiology (Reading, Engl)* 152(Pt 6):1799-1806.
- Rosche WA & Foster PL (2000) Determining mutation rates in bacterial populations. *Methods* 20(1):4-17.
- Rosen DA, Hooton TM, Stamm WE, Humphrey PA & Hultgren SJ (2007a) Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Med* 4(12):e329.
- Rosen DA, Thomas M, Hooton, Walter E, Stamm & Peter A, Humphrey SJH (2007b) Detection of Intracellular Bacterial Communities in Human Urinary Tract Infection. *Plos medicine* 4(12).
- Russo, Carlino UB, Mong A & Jodush ST (1999) Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infect Immun* 67(10):5306-5314.
- Russo & Johnson JR (2003) Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* 5(5):449-456.
- Sabri M, Houle S & Dozois CM (2009) Roles of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ZnuACB and ZupT zinc transporters during urinary tract infection. *Infection and Immunity* 77(3):1155-1164.
- Saier MH, Young WS & Roseman S (1971) Utilization and transport of hexoses by mutant strains of *Salmonella Typhimurium* lacking enzyme I of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system. *Journal of Biological Chemistry* 246(18):5838-5840.
- Sambrook J & Russell DDW (2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://books.google.ca/books?id=YTxKwWUjBeUC>

- Schaechter M (2009) *Encyclopedia of Microbiology*. Elsevier Science. <http://books.google.ca/books?id=rLhdW5YzuO4C>
- Schilling JD, Mulvey MA & Hultgren SJ (2001) Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *J Infect Dis* 183 Suppl 1:S36-40.
- Schönbrunn E, Sack S, Eschenburg S, Perrakis A, Krekel F, Amrhein N & Mandelkow E (1996) Crystal structure of UDP-N-acetylglucosamine enolpyruvyltransferase, the target of the antibiotic fosfomycin. *Structure* 4(9):1065-1075.
- Scortti M, Lacharme-Lora L, Wagner M, Chico-Calero I, Losito P & Vazquez-Boland JA (2006) Coexpression of virulence and fosfomycin susceptibility in *Listeria*: molecular basis of an antimicrobial in vitro-in vivo paradox. *Nature medicine* 12(5):515-517.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D & D'Ari R (2007) *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *Journal of Bacteriology* 189(23):8746-8749.
- Shrestha, K N & Tomford JW (2001) Fosfomycin: a review. *Infectious Diseases in Clinical Practice* 10(5):255-260.
- Snyder, Haugen BJ, Lockett CV, Maroncle N, Hagan EC, Johnson DE, Welch RA & Mobley HL (2005) Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 73(11):7588-7596.
- Snyder J, Lloyd AL, Lockett CV, Johnson DE & Mobley HLT (2006) Role of phase variation of type 1 fimbriae in a uropathogenic *Escherichia coli* cystitis isolate during urinary tract infection. *Infection and Immunity* 74(2):1387-1393.
- Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lockett CV, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA & Mobley HLT (2004) Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infection and Immunity* 72(11):6373-6381.
- Strober W (2011) Adherent-invasive *E. coli* in Crohn disease: bacterial “agent provocateur”. *The Journal of clinical investigation* 121(3):841.
- Suarez JE & Carmen MM (1991) Plasmid-Encoded Fosfomycin Resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy* Vol. 35 (No. 5):791-795.
- Takahata S, Ida T, Hiraishi T, Sakakibara S, Maebashi K, Terada S, Muratani T, Matsumoto T, Nakahama C & Tomono K (2010) Molecular mechanisms of fosfomycin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli*. *International journal of antimicrobial agents* 35(4):333-337.
- Taylor EN & Curhan GC (2006) Body size and 24-hour urine composition. *American journal of kidney diseases* 48(6):905-915.
- Thirion DJG & Williamson D (2003) Les infections urinaires une approche clinique. *Pharmactuel - Pharmacothérapie* 36(5).
- Tian ZX, Li QS, Buck M, Kolb A & Wang YP (2001) The CRP-cAMP complex and downregulation of the *glnAp2* promoter provides a novel regulatory linkage between carbon metabolism and nitrogen assimilation in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology* 41(4):911-924.

- Timothy J, Larson S, John S. Cantwell & Loo-Bhattacharya ATv (1992) Interaction at a Distance between Multiple Operators Controls the Adjacent, Divergently Transcribed gZpTQ-gZpACB Operons of *Escherichia coli* K-12". *The journal of biological chemistry* 267(9):6114-6121.
- Tony Mazzulli, Skulnick M, Glen Small, Wayne Marshall, Darryl J Hoban & Zhanel GG (2001) Susceptibility of community Gram-negative urinary tract isolates to mecillinam and other oral agents. *Can J Infect Dis* 12(5):189-292.
- Torres (2010) *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Bentham e Books. <http://books.google.ca/books?id=651HFhtY748C>
- Torres, Redford, Welch & S P (2001) TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity* 69(10):6179-6185.
- Triton-Pharma-Inc. (2012) MONUROL™ 3g Sachet (Fosfomycin Tromethamine). *Product Monograph*.
- van Heijenoort J (2001) Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology* 11(3):25R-36R.
- Voet D & Voet J, Biochimie . de Boeck Université, chap. 12, 2005. *Références du chapitre 2*.
- Warren JW, Abrutyn E, Hebel JR, Johnson JR, Schaeffer AJ & Stamm WE (1999) Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clinical Infectious Diseases* 29(4):745-759.
- Waters VL & Crosa JH (1991) Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* 55(3):437-450.
- Welch RA, Burland V, Plunkett G, 3rd, Redford P, Roesch P, Rasko D, Buckles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HL, Donnenberg MS & Blattner FR (2002) Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(26):17020-17024.
- Wiles TJ, Kulesus RR & Mulvey MA (2008) Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Exp Mol Pathol* 85(1):11-19.
- Zdziarski J, Svanborg C, Wullt B, Hacker J & Dobrindt U (2008) Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation? *Infection and Immunity* 76(2):695-703.
- Zourob M, Elwary S & Turner A (2008) *Principles of Bacterial Detection: Biosensors, Recognition Receptors and Microsystems: Biosensors, Recognition Receptors, and Microsystems*. Springer. <http://books.google.ca/books?id=b3vgZkxROWYC>