

INRS-Institut Armand-Frappier

**Isolement de gènes pathospécifiques d'une souche uropathogène d'*Escherichia coli*
et caractérisation de facteurs de virulence identifiés.**

Par

Simon Léveillé

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

Jury d'évaluation

Président du jury
et examinateur interne

Rolf Morosoli, INRS-Institut Armand-Frappier

Examineur externe

Michaël Mourez
Faculté de médecine vétérinaire
Université de Montréal

Directeur de recherche

Charles M. Dozois, INRS-Institut Armand-Frappier

Résumé

Escherichia coli est une bactérie très diversifiée comprenant des souches commensales et des souches pathogènes. Les souches pathogènes causent divers types d'infections intestinales et extra-intestinales. L'infection urinaire est une maladie extra-intestinale qui affecte plus de la moitié des femmes au moins une fois durant leur vie. *E. coli* en est la principale cause. Les souches pathogènes possèdent de l'information génétique supplémentaire qui ne se retrouve pas chez les souches non-pathogènes. Cette information génétique code pour des facteurs de virulence permettant d'établir l'infection chez l'hôte. La plupart des souches d'*E. coli* causant l'infection urinaire possèdent un certain nombre de ces facteurs. Récemment, un groupe de souches d'*E. coli* causant l'infection urinaire chez lesquelles il manque plusieurs facteurs de virulence classiques a été identifié aux États-Unis. Malgré l'absence de ces facteurs de virulence, ce groupe de souches nommé « clonal group A » (CGA) est néanmoins capable de causer l'infection. Ce qui suggère que ce groupe de souches doit posséder d'autres facteurs de virulence lui permettant de causer l'infection. Une souche représentante de ce groupe a été sélectionnée et deux expériences à l'aide de techniques d'identification de gènes pathospécifiques différentes ont été réalisées.

Dans un premier temps, la souche CGA sélectionnée a été employée dans un modèle d'infection urinaire murin et les organes infectés ont été utilisés pour la technique de SCOTS. Cette technique permet la capture de transcrits bactériens exprimés *in vivo*. Elle nous a permis d'identifier *iha* comme un gène exprimé par cette souche dans le rein de la souris. Malgré le fait que ce gène ait déjà été identifié chez d'autres souches d'*E. coli*, nous avons approfondi sa caractérisation avec la souche CGA. *Iha* a premièrement été décrit comme une adhésine possédant une forte homologie avec certains récepteurs de sidérophore. Nous avons confirmé ce phénotype d'adhésion cellulaire en comparaison avec d'autres récepteurs de sidérophore. Nous avons démontré que *Iha* peut fonctionner comme un récepteur du sidérophore entérobactine ou de ses produits de dégradation. La régulation de l'expression de ce gène a été étudiée et il est régulé par la concentration de fer disponible dans le milieu ainsi que par la protéine régulatrice Fur. Son rôle dans

l'établissement de l'infection a été confirmé par l'atténuation d'un mutant par rapport à la souche sauvage dans le modèle d'infection urinaire murin.

Dans un deuxième temps, la différence génétique entre la souche sélectionnée et une souche d'*E. coli* causant l'infection urinaire classique a été étudiée par l'emploi de l'hybridation soustractive. Cette technique de comparaison de l'ADN génomique des deux souches nous a permis d'identifier un système de sécrétion de type trois hypothétique nommé ETT2. Ce dernier a déjà été identifié chez d'autres souches d'*E. coli*, cependant, il est non-fonctionnel chez la plupart de celles-ci et aucune preuve n'a été apportée montrant que le système intact joue un rôle dans l'infection. Nous avons débuté la caractérisation de ce système avec la souche CGA comme modèle. Le système ne semble pas conférer un phénotype accru d'invasion de cellules épithéliales en culture et à première vue, un mutant ne semble pas atténué dans le modèle d'infection urinaire chez la souris.

En bref, une souche membre d'un groupe clonale d'*E. coli* causant l'infection urinaire a été étudiée, deux facteurs de virulence potentiels ont été identifiés et ont fait l'objet d'une caractérisation plus poussée.


Étudiant


Directeur de recherche

Remerciements

Tout d'abord j'aimerais remercier chaleureusement mon directeur de recherche qui a su me communiquer son amour et sa passion pour la science. Il a été un directeur de recherche exceptionnel, autant pour ses connaissances que pour sa disponibilité et sa gentillesse. Grâce à lui, au cours de ma maîtrise, j'ai effectué un stage au laboratoire du Dr. J.R. Johnson à Minneapolis, participé à deux congrès : un à Halifax et un à San Francisco. Charles tu m'as fait découvrir et aimer la recherche scientifique et je t'en suis extrêmement reconnaissant. Merci Charles!

J'aimerais également remercier France Daigle et Sébastien Faucher pour leur précieuse aide technique. Merci au Dr. James R. Johnson et à sa technicienne Connie Clabots pour leur accueil lors du stage, leur participation aux travaux avec les infections urinaires chez la souris ainsi que leur disponibilité. Merci aux membres du laboratoire pour leur aide et support.

Je suis reconnaissant au « Fonds de recherche en santé du Québec » pour le soutien financier ainsi qu'à la fondation Armand-Frappier pour la bourse « Congrès hors Québec ».

Table des matières

Résumé	I
Remerciements	III
Table des matières	V
Liste des figures	IX
Liste des tableaux	XI
Liste des abréviations	XII
Introduction	1
Chapitre I : Revue de littérature	5
1.1 <i>Escherichia coli</i>	7
1.1.1 Les infections intestinales	7
1.1.2 Les infections extra-intestinales	8
1.2 L'infection urinaire.....	8
1.2.1 Facteurs prédisposants	9
1.2.2 L'infection au niveau cellulaire.....	10
1.2.3 Le système urinaire; un environnement inhospitalier	12
1.3 Les facteurs de virulence.....	14
1.4 L'adhésion et l'invasion chez les UPEC.....	14
1.4.1 Les fimbriae de type 1	15
1.4.2 Les fimbriae de type P.....	17
1.4.3 Les fimbriae S/F1C.....	17
1.4.4 Les adhésines Afa/Dr	18
1.5 Système de sécrétion de type III.....	18
1.6 L'acquisition du fer chez les UPEC.....	19
1.6.1 Le fer : importance, disponibilité et toxicité.	19
1.6.2 La séquestration du fer chez l'hôte	20
1.6.3 Les différents systèmes d'acquisition du fer chez les UPEC	21

1.6.4 Les sidérophores et leur machinerie	22
1.6.5 L'entérobactine et son transport	23
1.6.6 Les autres sidérophores d' <i>E. coli</i>	26
1.6.7 Les colicines	26
1.6.8 Importance <i>in vivo</i> des systèmes d'acquisition du fer	27
1.7 Autres facteurs de virulence associées aux UPEC	27
1.7.1 Le « Cytotoxic necrotising factor 1 » (CNF1)	27
1.7.2 L' α -hémolysine	28
1.7.3 Les autotransporteurs	28
1.7.4 Résistance à la phagocytose et au sérum	29
1.8 La régulation de l'expression des facteurs de virulence	30
1.8.1 Les régulateurs globaux	31
1.8.2 Le cas de régulation des fimbriae	32
1.8.3 Le régulateur Fur	32
1.9 La diversité d' <i>E. coli</i>	34
1.9.1 Le génome	34
1.9.2 L'acquisition de matériel génétique supplémentaire	35
1.9.3 Les îlots de pathogénicité.....	36
1.9.4 La clonalité chez <i>E. coli</i>	37
1.9.5 Le sérotypage.....	38
1.9.6 La distribution phylogénétique et la collection ECOR.....	38
1.9.7 Le groupe clonal A	41
1.10 Percer la diversité pathogénique d' <i>E. coli</i>	42
1.10.1 L'hybridation soustractive.....	42
1.10.2 « <i>In vivo</i> expression technology » (IVET)	45
1.10.3 « Signature-tagged mutagenesis » (STM).....	46
1.10.4 « Selective capture of transcribed sequences » (SCOTS).....	47
1.10.5 Le séquençage génomique et les biopuces.....	50
1.10.6 Autres méthodes dignes de mention	51
1.11 De l'identification d'un gène au facteur de virulence établi.....	52
1.11.1 Création de mutants par la technique du système recombinase λ Red	52

Chapitre II : Expérimentations préalables et supplémentaires	55
2.1 Identification de gènes pathospécifiques	57
2.1.1 Résultats obtenus à l'aide de SCOTS	57
2.1.2 Résultats obtenus à l'aide de l'hybridation soustractive	60
2.2 Le système de sécrétion de type trois (SSTT) identifié	62
2.2.1 Présentation du système	62
2.2.2 Travaux effectués sur le système ETT2	63
2.2.2.1 Criblage	63
2.2.2.2 Mutant.....	63
2.2.2.3 Phénotype d'invasion cellulaire.....	64
2.2.2.4 Infection chez la souris.....	65
 Chapitre III : Article scientifique	 67
3.1 Contribution des auteurs à l'article.....	69
3.2 Article: <i>Iha</i> from an <i>Escherichia coli</i> UTI Outbreak Clonal Group A Strain is Expressed <i>In Vivo</i> in the Mouse Urinary Tract and Functions as a Siderophore Receptor and Adhesin.....	70
3.2.1 ABSTRACT	71
3.2.2 INTRODUCTION	72
3.2.3 MATERIALS AND METHODS.....	74
3.2.3.1 Bacterial and cell culture.	74
3.2.3.2 Selective capture of transcribed sequences (SCOTS).....	74
3.2.3.3 Cloning the <i>iha</i> and <i>fepA</i> genes.	75
3.2.3.4 Growth in iron-limited medium.	75
3.2.3.5 Colicin sensitivity test..	76
3.2.3.6 Adherence assays.	76
3.2.3.7 Construction of <i>iha</i> and <i>fur</i> mutants.....	76
3.2.3.8 Quantitative real-time RT-PCR.	77

3.2.3.9 Mouse infection experiment.....	78
3.2.3.10 Nucleotide sequence accession number.....	78
3.2.4 RESULTS.....	79
3.2.4.1 <i>iha</i> is expressed by CGA strain UCB34 during UTI.....	79
3.2.4.2 <i>iha</i> from UCB34 functions as a siderophore receptor in <i>E. coli</i> K-12 strain H5058.....	79
3.2.4.3 <i>iha</i> does not confer susceptibility to colicins Ia and B.....	80
3.2.4.4 Iha from UCB34 functions as an adhesin in <i>E. coli</i> K-12 strain ORN172....	81
3.2.4.5 <i>iha</i> expression is modulated by iron availability and Fur but not contact with host cells.....	82
3.2.4.6 Iha contributes to virulence of CGA strain UCB34 during UTI.....	83
3.2.5 DISCUSSION.....	84
3.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS.....	89
3.2.7 REFERENCES.....	90
3.2.8 TABLES.....	95
3.2.9 FIGURES.....	99
3.3 Accusé de réception.....	105
Chapitre IV : Discussion	107
4.1 SCOTS et Iha.....	109
4.2 L'hybridation soustractive et le système ETT2.....	111
4.3 Perspective.....	117
Conclusion	120
Références	121

Liste des figures

Revue de littérature

Fig. 1.1. Le modèle d'infection urinaire au niveau cellulaire.....	12
Fig. 1.2. Représentation des différents systèmes de virulence retrouvés chez les souches d' <i>E. coli</i> uropathogène.....	14
Fig. 1.3. Les réactions d'oxydation et de réduction du fer	20
Fig. 1.4. La structure de l'entérobactine et son système de transport	25
Fig. 1.5. La régulation transcriptionnelle par la protéine Fur	33
Fig. 1.6. Diagramme comparatif des protéines retrouvées dans le génome de trois souches d' <i>E. coli</i>	35
Fig. 1.7. La collection ECOR représentant la classification phylogénétique d' <i>E. coli</i>	40
Fig. 1.8. Principe de l'hybridation soustractive suppressive.	44
Fig. 1.9. Représentation schématique de la technique de SCOTS	49
Fig. 1.10. La création de mutant par la technique de Datsenko et Wanner	54

Expérimentations préalables et supplémentaires

Fig. 2.2 Nombre de bactéries présent dans l'urine, la vessie, et les reins de souris coinfectées avec la souche sauvage UCB34 et la souche complémetée QT896.....	59
Fig. 2.1. Représentation du SSTT hypothétique ETT2	62
Fig. 2.3 Nombre de bactéries présent dans l'urine, la vessie, et les reins de souris coinfectées avec la souche sauvage UCB34 et son mutant <i>eivAEG::cat</i> QT791	66

Article

FIG. 3.1. Sequence of the predicted <i>iha</i> promoter region and is putative Fur box	99
FIG. 3.2. Growth of <i>E. coli</i> K-12 siderophore receptor-negative strain H5058 containing recombinant <i>iha</i> , <i>fepA</i> , or the control vector, in iron-limited medium.....	100

FIG. 3.3. T24 epithelial bladder cells after interaction with the poorly adherent *E. coli* K-12 strain ORN172 containing *iha* or the control vector pBluescript II SK..... 101

FIG. 3.4. Quantitative adherence of *E. coli* K-12 ORN172 containing *iha* or *fepA* cloned or control vector 102

FIG. 3.5. Expression level of *iha* and *fepA*, as determined by real-time PCR in different culture conditions for wild-type strain UCB34 and its *fur* derivative QT796..... 103

FIG. 3.6. Bacterial numbers present in the urine, bladder, and kidneys of mice co-infected with wild-type strain UCB34 and isogenic *iha* mutant QT686. 104

Liste des tableaux

Revue de littérature

Tableau 1.1. Les adhésines typiquement associées aux <i>E. coli</i> uropathogènes.	15
---	----

Expérimentations préalables et supplémentaires

Tableau 2.1. Les clones obtenus par hybridation soustractive entre la souche UCB34 et CFT073.	61
--	----

Article

TABLE 3.1. <i>E. coli</i> strains and plasmids.	95
TABLE 3.2. Protein sequence Identity-similarity to Iha.	96
TABLE 3.3. Colicin sensitivity of <i>iha</i> and <i>fepA</i> clones in <i>E. coli</i> K-12 strain H5058 compared to <i>E. coli</i> K-12 strain MG1655.	97
TABLE 3.4. Bacterial recovery from infected tissues and urine of mice infected with wild-type UCB34 and UCB34 <i>iha</i> mutant QT686.	98

Liste des abréviations

Aa	acides aminés
ADN	acide déoxyribonucléique
ADNc	acide déoxyribonucléique complémentaire
ADNr	acide déoxyribonucléique ribosomal
ARN	acide ribonucléique
ARNm	acide ribonucléique messenger
ARNr	acide ribonucléique ribosomal
CFU	« colonie forming unit »
CGA	« clonal group A »
CNF	« cytotoxic necrosing factor 1 »
DFI	« Differential fluorescence induction »
DHBS	2,3-dihydroxybenzoyl sérine
dNTP	« deoxyribonucleotide triphosphate »
ECOR	« <i>E. coli</i> reference collection »
EHEC	« enterohemorrhagic <i>E. coli</i> »
EIEC	« enteroinvasive <i>E. coli</i> »
EPEC	« enteropathogenic <i>E. coli</i> »
ETEC	« enterotoxigenic <i>E. coli</i> »
ETT2	« <i>E. coli</i> type III secretion 2 »
ExPEC	« extra-intestinal pathogenic <i>E. coli</i> »
Fur	« ferric-uptake regulator »
HS	hybridation soustractive
IU	infection urinaire
IS	« insertional sequence »
IVET	« <i>in vivo</i> expression technology »
IVIAT	« <i>in vivo</i> -induced antigen technology »
K-12	souche d' <i>E. coli</i> non-pathogène souvent employée en laboratoire
Kb	kilobase

LEE	« locus of enterocyte effacement »
LPS	lipopolysaccharide
Mb	mégabase
MLLE	« multilocus enzyme electrophoresis »
MLST	« multilocus sequence typing »
PAI	« pathogenicity island »
PCR	« polymerase chain reaction »
Pb ou bp	paire de base
UPEC	« uropathogenic <i>E. coli</i> »
UTI	« urinary tract infection »
RFLP	« restriction fragment length polymorphism »
RT-PCR	« reverse transcriptase PCR »
SCOTS	« selective capture of transcribed sequences »
SPI	« <i>Salmonella</i> pathogenicity island »
SSTT	système de sécrétion de type trois
STM	« Signature-tagged mutagenesis »

Introduction

L'infection urinaire (IU) est caractérisée par la présence de microorganismes pathogènes dans le système urinaire. Elle est considérée comme l'infection bactérienne la plus commune dans les pays industrialisés. Plus de la moitié des femmes vont être au prise avec une IU au moins une fois au cours leur vie. La plupart des IU se manifestent par une infection au niveau de la vessie c'est-à-dire un épisode de cystite, mais dans certains cas, l'infection peut atteindre les reins et causer une pyélonéphrite. Parmi les femmes victimes d'IU, de 20 à 30% subissent des épisodes de récurrence (Finer et Landau, 2004; Foxman, 2002; Gupta et Stamm, 2005). Il est estimé qu'aux États-Unis, environ 7 à 8 millions de visites médicales sont reliées aux IU. En tenant compte des coûts rattachés aux visites médicales, à la thérapie antibiotique, aux cas d'hospitalisation ainsi qu'aux congés de maladie et la perte de productivité, les coûts engendrés par ce type d'infection frôlent les 2 milliards de dollars annuellement aux États-Unis (Foxman *et al.*, 2000; Foxman, 2002). Il existe plusieurs traitement antibiotiques efficaces contre les IU (Warren *et al.*, 1999). Cependant, le taux de résistance des bactéries pathogènes s'accroît. De plus, il a été montré que les bactéries pathogènes sont capables de rester dans le système urinaire de façon latente et asymptomatique pour ensuite recuser l'infection. Lorsqu'elles sont présentes sous cette forme, les bactéries ne sont pas susceptibles aux antibiotiques (Mulvey *et al.*, 2000). Ensemble, ces faits accentuent la nécessité d'étudier les pathogènes causant ce type d'infection en vue de comprendre leurs modes d'action et de développer de nouvelles cibles thérapeutiques et vaccinales.

Escherichia coli est l'agent causale des IU dans plus de 80% des cas (Nicolle, 2002; Ronald, 2002). *E. coli* est une espèce bactérienne aux multiples facettes dont la grande majorité est représentée par des souches commensales de la flore intestinale. Toutefois, elle comprend également des souches pathogènes qui causent deux grands types d'infections : les infections intestinales et les infections extra-intestinales. L'IU est une des infections extra-intestinales causée par certaines souches d'*E. coli*. Les souches pathogènes possèdent certains éléments qui leur permettent d'établir l'infection et qui sont absents des souches non-pathogènes (Dozois et Curtiss, 1999; Farthing, 2004;

Johnson, 1991). Ce sont les facteurs de virulence. Ces derniers comprennent des organelles d'adhésion et/ou d'invasion cellulaire, des systèmes de séquestration du fer, la production de toxines ainsi que de différentes composantes permettant d'échapper au système immunitaire de l'hôte (Emody *et al.*, 2003; Johnson, 1991; Johnson, 2003). La présence de ces facteurs chez certains groupes d'*E. coli* est souvent associée au type d'infection que ce groupe peut causer.

En plus de causer différents types d'infections, les souches d'*E. coli* pathogènes possèdent un bagage génétique très diversifié. La taille de leur génome ainsi que leur contenu varient considérablement par rapport aux souches commensales ainsi qu'entre différentes souches pathogènes (Welch *et al.*, 2002). Ces différences génomiques correspondent à la présence de sections d'ADN supplémentaires codant pour les facteurs de virulence (Dozois et Curtiss, 1999). L'identification de ces facteurs est un pas majeur dans la compréhension de la pathogenèse de ces microorganismes. Plusieurs techniques visant l'identification de ces différences ont été élaborées et employées afin d'approfondir nos connaissances sur ce sujet (Handfield et Levesque, 1999). Elles ont permis l'identification et la caractérisation de plusieurs facteurs de virulence autant chez *E. coli* que d'autres bactéries pathogènes.

Les recherches des dernières années effectuées sur les *E. coli* uropathogènes (UPEC) se sont concentrées sur un nombre limité de souches typiques. Il existe cependant toute une diversité d'isolats cliniques qui ne correspondent pas à ces souches typiques. C'est le cas d'un groupe de souches récemment découvert et qui a été responsable d'une série d'épidémie d'IU aux États-Unis (Manges *et al.*, 2001). Ce groupe nommé CGA, possède une association phylogénétique différente des souches typiquement étudiées, elles ne possèdent que très peu des facteurs de virulences connus et elles sont associées à une grande résistance aux antibiotiques (Johnson *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005c; Manges *et al.*, 2001). Il a maintenant été démontré que ce groupe clonal est répandu à travers les États-Unis et se retrouve également ailleurs à travers le monde (Johnson *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005c). Le caractère atypique de ces souches et le fait qu'il leur manque plusieurs facteurs de virulence classiques sans pour autant affecter leur

pathogénicité permet de poser l'hypothèse suivante : les souches membres du groupe CGA doivent posséder d'autres facteurs de virulence leur permettant d'établir l'infection.

L'objectif du projet était donc d'identifier des facteurs de virulence importants chez le groupe CGA et de débiter la caractérisation de certains d'entre eux. Une souche représentante de ce groupe a été sélectionnée et deux techniques permettant l'identification de gènes pathospécifiques ont été employées soit SCOTS et l'hybridation soustractive. Par la suite, deux systèmes ont été sélectionnés en vue d'une caractérisation plus approfondie. Chez le premier système, nommé Iha, nous avons étudié : deux phénotypes *in vitro*, la régulation de son expression ainsi que son importance *in vivo* dans un modèle d'infection murin. Les résultats générés par ces travaux ont donné lieu à un article. Le deuxième système, est un homologue à un système de sécrétion de type trois. Pour ce dernier, nous avons effectué : un criblage chez les souches CGA, une tentative d'identification de phénotype *in vitro* et une étude de son importance *in vivo* dans le modèle d'IU. Les travaux sur ce système devront être poursuivis afin de pouvoir le classer comme facteur de virulence ou pour réfuter cette hypothèse.

Ce mémoire est présenté sous forme de mémoire par article. Il est divisé en quatre grandes sections. La première correspond à la revue de littérature. La seconde présente les résultats supplémentaires ayant mené à l'identification de gènes uniques à la souche CGA et à l'élaboration de l'article ainsi que les travaux sur le deuxième système étudié qui ne font pas partie de l'article. La troisième section est l'article qui porte sur la caractérisation du système Iha. La dernière correspond à une discussion de l'ensemble des résultats suivie d'une conclusion générale.

Chapitre I

Revue de littérature

1.1 *Escherichia coli*

Le système digestif humain comprend une microflore symbiotique qui lui est essentielle. Celle-ci est composée principalement de bactéries anaérobies et d'une moins grande proportion d'anaérobies facultatifs. *Escherichia coli* est la bactérie anaérobie facultative la plus commune du système gastrointestinal humain. *E. coli* demeure généralement une bactérie commensale et l'équilibre de cette symbiose dépend à la fois de la présence de facteurs génétiques chez la souche bactérienne et de la susceptibilité de l'hôte. Les souches d'*E. coli* pathogènes causent deux grands types d'infections : les infections intestinales et les infections extra-intestinales (Farthing, 2004; Johnson, 1991).

1.1.1 Les infections intestinales

Les souches causant les maladies intestinales sont classées en cinq grands groupes selon les mécanismes pathogéniques et la forme de diarrhée qu'elles causent. Les ETEC « enterotoxigenic *E. coli* » sont définies par la production de la toxine thermosensible LT ou de la toxine thermostable ST ou encore des deux. Une fois l'intestin colonisé, ces toxines engendrent l'excrétion d'ions de chlore causant la diarrhée. Cette forme de diarrhée est communément appelée la diarrhée du voyageur. Les EPEC « enteropathogenic *E. coli* » sont caractérisées par la création d'une lésion cellulaire au niveau de l'intestin de type « attachant-effaçant ». Une fois attachées aux cellules intestinales, les EPEC vont créer un réarrangement du cytosquelette de l'hôte. Ce type de diarrhée est persistante et elle affecte particulièrement les enfants des pays en voie de développement. Les EHEC « enterohemoragic *E. coli* » sont caractérisées par une diarrhée sanglante causée par la production d'une ou de deux Shiga-toxines (Stx). Ces toxines inhibent la synthèse protéique des cellules de l'hôte et conduisent à la mort cellulaire. Les EHEC sont d'origine épidémique et associées à la flore normale bovine. Elles causent la maladie connue sous le nom de « maladie du hamburger ». Les EAEC « enteroaggregative *E. coli* » causent une diarrhée persistante et leur pathogenèse est moins bien définie. Quant aux EIEC « enteroinvasive *E. coli* », elles sont très similaires à

Shigella et sont des bactéries qui envahissent et se multiplient intracellulairement. (Dozois et Curtiss, 1999; Farthing, 2004; Nataro et Kaper, 1998).

1.1.2 Les infections extra-intestinales

Lorsqu'elles se retrouvent hors du système digestif, les *E. coli* pathogènes extra-intestinale (ExPEC) peuvent causer diverses maladies soit; des infections urinaires, des méningites néonatales ainsi que des bactériémies et septicémies. Les *E. coli* causant les infections urinaires sont nommées UPEC « uropathogenic *E. coli* » (Johnson, 2003).

1.2 L'infection urinaire

Les infections urinaires (IU) réfèrent à la présence de microorganismes pathogènes dans le système urinaire. Ce type d'infection est considéré comme l'infection bactérienne la plus commune dans les pays industrialisés. Les femmes sont plus susceptibles à ce type d'infection que les hommes et ceci s'explique par la longueur inférieure de leur urètre. Environ la moitié des femmes vont avoir au moins un épisode d'IU au cours de leur vie et parmi celles-ci, environ le quart vont subir des épisodes de récurrence (Finer et Landau, 2004; Foxman, 2002). *E. coli* est la principale cause d'IU avec environ 80 à 85% des cas. *Staphylococcus saprophyticus* compte pour environ 5-15% et les autres cas sont causés par différentes espèces tel que *Klebsiella*, *Proteus* et *Enterobacter* (Nicolle, 2002; Ronald, 2002). L'IU est généralement symptomatique avec douleur à la miction accompagnée de fréquents besoins urgents d'uriner. Ce type d'infection peut parfois s'aggraver et causer une pyélonéphrite accompagnée de symptômes plus graves comme de la douleur au flanc, fièvre et vomissements. L'aggravation peut parfois même se rendre jusqu'au développement d'une septicémie (Gupta et Stamm, 2005).

1.2.1 Facteurs prédisposants

Plusieurs facteurs rendent certaines sous-populations de femmes plus susceptibles que d'autres à ce type d'infection. Un premier facteur commun aux femmes prépubères et ménopausées est qu'elles produisent moins d'oestrogènes, ce qui engendre un pH vaginal autour de la neutralité. Par contraste, la femme féconde possède une plus grande concentration d'oestrogène ce qui diminue son pH vaginal. Ces effets de changement de pH en fonction de l'âge ont une grande influence sur la flore microbienne commensale du vagin qui joue normalement un rôle protecteur contre les infections simplement par sa présence (effet de compétition). Une flore altérée diminue la protection contre les bactéries uropathogènes puisque celles-ci doivent d'abord passer par le vagin avant d'atteindre l'urètre et la vessie (Hooton et Hooton et Stamm, 1996). Les jeunes femmes et les femmes plus âgées sont donc plus susceptibles aux IU que les femmes fécondes (Foxman, 2002). Les effets hormonaux ne se limitent pas uniquement à ceux liés à l'âge puisque la susceptibilité varie également en fonction du cycle menstruel. En effet il a été démontré que l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales est moins grande à faible pH lors du pic d'oestrogène (Schaeffer *et al.*, 2001). Les femmes enceintes montrent également une susceptibilité accrue aux IU ce qui peut engendrer des complications dans le développement normal de la grossesse. (Schaeffer *et al.*, 2001; Hooton et Stamm, 1996).

En dehors des effets hormonaux, plusieurs sous-populations de femmes possèdent une plus grande prédisposition aux IU. C'est le cas des personnes diabétiques, immunosupprimées ou présentant une infection chronique affectant leur système immunitaire. Dans les hôpitaux, les patients devant subir un cathétérisme vésical ont une chance très accrue de contracter une IU (Anderson *et al.*, 2004; Foxman, 2002; Hooton et Stamm, 1996). D'ailleurs, l'IU est la première cause d'infections nosocomiales (Foxman, 2002). Des études ont également fait une corrélation entre la fréquence des relations sexuelles et l'incidence des cas d'IU (Foxman, 2002; Ronald, 1996; Hooton et Stamm, 1996). De plus, le mode de contraception employé semble également important puisque

l'utilisation de mousse spermicide avec comme agent actif le Nonoxynol-9 augmente le risque de contracter une IU (Hooton et Stamm, 1996).

Des facteurs génétiques entrent également en ligne de compte. Par exemple, les femmes possédant un phénotype non-sécrétoire des antigènes du groupe sanguin sont plus susceptibles aux IU que celles possédant le phénotype sécrétoire (Finer et Landau, 2004; Foxman, 2002; Hooton et Stamm, 1996; Schaeffer *et al.*, 2001). La variation des antigènes de surface des cellules épithéliales du tractus urinaire dans une population rend certaines femmes plus susceptibles que d'autres puisque ces antigènes servent de point d'attachement pour les bactéries (Hooton et Stamm, 1996). Chez certaines femmes, une défectuosité au niveau de système immunitaire peut engendrer une plus grande susceptibilité. Par exemple, une sécrétion d'IgA déficiente a été associée à un risque plus élevé de développer une IU. De plus, un récepteur défectueux pour la cytokine proinflammatoire interleukine-8, qui fait la promotion de la migration des neutrophiles à travers les cellules uroépithéliales, est également lié à une plus grande susceptibilité (Finer et Landau, 2004; Schaeffer *et al.*, 2001; Uehling *et al.*, 1999). Il existe donc une multitude de facteurs qui rendent plus susceptibles certaines femmes durant certaines périodes de leur vie aux IU.

1.2.2 L'infection au niveau cellulaire

La colonisation se fait en général à partir de la flore rectale qui se retrouve dans la région urogénitale et migre vers l'urètre pour éventuellement se rendre à la vessie. La majorité des bactéries qui se rendent au niveau du système urinaire sont éliminées par la miction et par le système immunitaire de l'hôte. Cependant un faible pourcentage arrive à s'attacher aux cellules uroépithéliales à l'aide d'organelles de surface et ainsi causer une infection plus sévère (Bower *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2000). Traditionnellement, les UPEC n'étaient pas considérées comme des pathogènes intracellulaires, cependant, de récentes découvertes ont permis d'établir le modèle d'UPEC intracellulaire (Anderson *et al.*, 2004; Bower *et al.*, 2005).

Le modèle proposé est schématisé à la figure 1.1. Une fois que les bactéries atteignent la vessie, un faible nombre d'entre elles arrivent à adhérer et à envahir les cellules épithéliales. Les bactéries se multiplient intracellulairement de façon très rapide à l'intérieur de vacuoles. Des photos en microscopie ont montré que les bactéries semblent être sous un autre stade adoptant une forme plus petite et plus ronde qu'à la normale. Par la suite, le système de l'hôte répondrait par une exfoliation de type apoptotique des cellules infectées. Cette action permet d'éliminer une bonne partie des bactéries, cependant, par le fait même elle rend disponible des tissus plus profonds. À ce moment, les bactéries se différencieraient en longs filaments, ce qui leur permettraient d'envahir de nouvelles cellules ainsi que les tissus sous-épithéliaux. Les bactéries resteraient par la suite sous forme latente dans des biofilms intracellulaires à l'abri du système immunitaire et des traitements antibiotiques. Elles pourraient ensuite ressortir suite à un stimuli quelconque ou une baisse de surveillance de la part du système immunitaire. Ce modèle explique bien l'excrétion d'urine stérile pendant une bonne période de temps suivie d'une réémergence de l'infection qui a été observée chez les patientes et dans les modèles animaux. Ces observations corrélaient aussi avec les épisodes de récurrence vécus par environ le quart des patientes souffrant d'IU. La vessie servirait donc de réservoir pour une éventuelle recolonisation suite à un stimuli, un peu à la manière du cycle lytique d'un virus. Une autre hypothèse pour expliquer les cas de récurrence est la recolonisation par la même souche qui serait présente de façon asymptomatique dans le système digestif. Cependant de plus en plus de données appuient le modèle de la réplication intracellulaire et de la latence. (Anderson *et al.*, 2003; Bower *et al.*, 2005; Mulvey *et al.*, 2000; Mulvey *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2002)

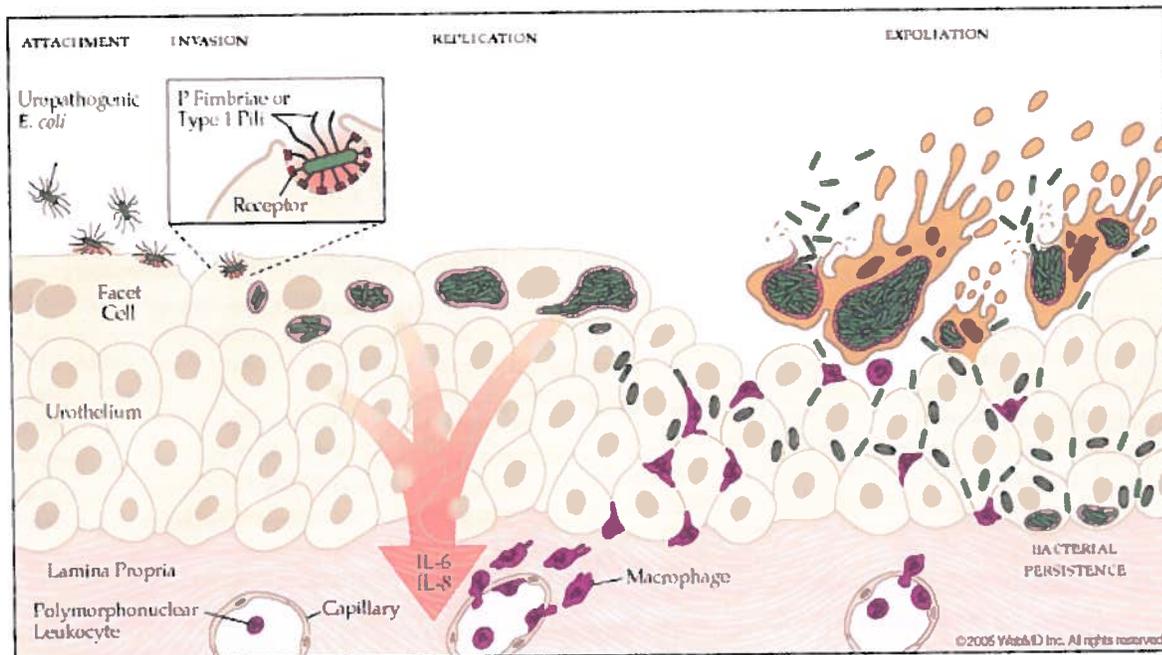


Fig. 1.1. Le modèle d'infection urinaire présentement accepté, les UPEC s'attachent et envahissent les cellules épithéliales de la vessie, elles se multiplient intracellulairement, s'attaquent aux tissus plus profonds suite à l'exfoliation et forment des réservoirs intracellulaires servant de bassin pour la recolonisation future. Image tirée de (Gupta et Stamm, 2005).

1.2.3 Le système urinaire; un environnement inhospitalier

Le système urinaire est généralement un environnement stérile. Avant de se rendre au système urinaire, une bactérie pathogène doit compétitionner avec la flore endogène du vagin composée principalement de *Lactobacillus* (Hooton et Stamm, 1996). Par la suite les bactéries doivent remonter l'urètre et faire face au flot d'urine. L'urine avec son acidité, son osmolarité élevée, sa forte concentration de sels, d'urée et d'acide organiques, contribue d'elle même à inhiber la croissance et la survie bactérienne. De plus, comme dans la plupart des sites d'infection, la bactérie doit compétitionner pour l'obtention du fer qui se retrouve lié aux protéines chélatrices de l'hôte (Schilling *et al.*, 2001; Snyder *et al.* 2004). Le tissu épithélial de la vessie est composé d'une série de couches de cellules et il constitue une formidable barrière physique (Mulvey *et al.*, 2000). Plusieurs facteurs interfèrent également avec la bactérie pour diminuer ses chances d'adhésion à l'épithélium, comme les protéines Tamm-Horsfall, les anticorps sécrétoires IgA, le mucus

et la présence de petites molécules de différents sucres (Mulvey *et al.*, 2000; Saemann *et al.*, 2005; Schilling *et al.*, 2001).

Le système immunitaire de l'hôte est également enclenché par la présence bactérienne. D'ailleurs le test clinique couramment employé pour le diagnostic des IU est basé sur un test colorimétrique révélant la présence d'une enzyme sécrétée par les leucocytes dans l'urine, la leucocyte estérase. En présence de bactéries, les cellules épithéliales se mettent à produire les cytokines proinflammatoires IL-6 et IL-8 qui recrutent les neutrophiles et macrophages. Ceux-ci passent la barrière uroépithéliale pour se rendre au site d'infection et éliminent les bactéries par phagocytose (Schilling *et al.*, 2001; Uehling *et al.*, 1999) (voir Fig. 1.1). Une fois que les bactéries ont réussi à adhérer aux cellules épithéliales et à envahir, l'hôte répond par l'apoptose et l'exfoliation de ces cellules. Cette stratégie permet d'éliminer une bonne partie de l'infection en rendant les bactéries intracellulaires disponibles à la phagocytose par les neutrophiles. Par contre, elle expose des tissus plus profonds à son adversaire. La réponse immunitaire adaptative est également employée dans la lutte contre ce type d'infection. Les lymphocytes B en collaboration avec les lymphocytes T produisent des anticorps de type IgA sécrétés qui ont pour rôle de promouvoir la phagocytose et d'inhiber l'adhésion bactérienne. (Mulvey *et al.*, 2000; Schilling *et al.*, 2001; Uehling *et al.*, 1999) Plusieurs facteurs sont donc présents afin de protéger l'hôte d'une colonisation bactérienne.

Pour survivre aux barrières physiques ainsi qu'à la réponse immunitaire de l'hôte, les bactéries colonisant le système urinaire doivent posséder certains atouts leurs permettant de faire face à cet environnement hostile.

1.3 Les facteurs de virulences

On définit un facteur de virulence comme un produit bactérien ou une stratégie qui contribue à l'habileté de la bactérie à causer l'infection (Wassenaar et Gastra, 2001; Salyers et Whitt, 2002). Les UPEC possèdent plusieurs facteurs de virulence leur permettant de causer l'infection. On y retrouve des systèmes permettant d'adhérer aux cellules, des systèmes pour l'acquisition du fer, la production de certaines toxines, les composantes de la paroi et de la capsule (voir Fig. 1.2) (Emody *et al.*, 2003; Johnson, 2003).

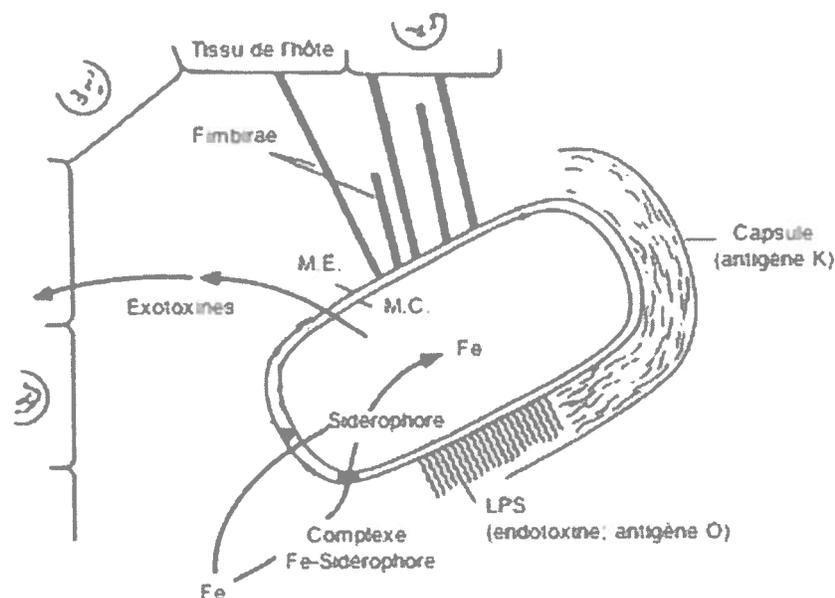


Fig. 1.2. Représentation des différents systèmes de virulence retrouvés chez les souches d'*E. coli* uropathogène. Adapté de (Johnson, 1991).

1.4 L'adhésion et l'invasion chez les UPEC

La présence des adhésines est un facteur de virulence très important pour les UPEC. Ces organelles leur permettent d'éviter d'être lessivées rapidement par le flot d'urine mais également d'initier l'étape d'invasion cellulaire (Mulvey, 2002). Les UPEC possèdent plusieurs adhésines, les plus importantes et les plus étudiées sont présentées au tableau 1.1 et le reste de cette section. Cependant, des adhésines moins bien caractérisées font l'objet d'études et plusieurs sont probablement encore à découvrir puisqu'une étude

récente rapporte qu'on peut observer un phénotype d'adhésion malgré l'absence des adhésines typiques (Miyazaki *et al.*, 2002b). Les termes fimbriae et pili désignent tous deux des organelles en forme de filament présents à la surface bactérienne et possédant une sous unité adhérente à son extrémité. Il existe également des adhésines dites afimbriaires c'est-à-dire que la sous-unité adhérente ne semble pas se trouver à l'extrémité d'un filament. Plusieurs adhésines chez les UPEC sont également reconnues comme possédant un rôle dans l'invasion cellulaire.

Tableau 1.1. Les adhésines typiquement associées aux *E. coli* uropathogènes. Traduit et adapté de (Mulvey, 2002).

Organelle	Adhésine spécifique	Type cellulaire reconnue	Maladie associée
Fimbriae de type 1	FimH	Cellules épithéliales de la vessie et du rein, cellules buccales, érythrocytes, macrophages, neutrophiles, matrice extracellulaire, autres bactéries, implants	Cystite, septicémie, méningite
Fimbriae de type P	PapG(I,II,III)	Cellules épithéliales du rein, érythrocytes	Pyélonéphrite
Fimbriae de type S/F1C	SfaS, SfaA/FocH	Cellules épithéliales de la vessie et du rein, érythrocytes, cellules endothéliales	Infection urinaire ascendante, septicémie, méningite
Adhésines Afa/Dr	Variée	Cellules épithéliales de la vessie et du rein, érythrocytes, neutrophiles, compartiments interstitiels du rein	Cystite, pyélonéphrite, diarrhée, septicémie

1.4.1 Les fimbriae de type 1

Cette adhésine est très commune chez *E. coli*, autant chez les souches pathogènes comme les UPEC que chez les souches non-pathogènes fécales (Johnson *et al.*, 1991; Johnson *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2005b). Il y a cependant un fort courant de pensée qui lui attribue une grande importance durant l'IU. Ces fimbriae sont codés par les gènes *fim*. La structure du fimbria est composée d'un corps basal de 7 nm de diamètre formé d'une répétition de la sous-unité FimA, superposée par une structure de 3 nm de diamètre composée de deux protéines adaptatrices FimF et FimG chapeautés de l'adhésine FimH.

Sa longueur peut atteindre quelques microns (Bower *et al.*, 2005; Mulvey, 2002). L'adhésine FimH est reconnue pour se lier à des résidus mannoses contenus sur des protéines glycosylées. Dans la vessie, le récepteur principal de FimH est présumément l'uroplakine. Cette glycoprotéine enrobée de résidues mannoses est connue pour former des hexamères qui s'assemblent par la suite en plaques et recouvrent les parois cellulaires de la vessie. Les UPEC peuvent donc s'y attacher par le biais de FimH. Il a été cependant montré que les UPEC exprimant les fimbriae de type 1 étaient également capables d'adhérer à des cellules épithéliales n'exprimant pas l'uroplakine (Bower *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2000). Il y a donc probablement d'autres glycoprotéines enrobées de mannose impliquées dans cette interaction. Il existe plusieurs variations mineures dans la séquence protéique de FimH issus de différents isolats. Ces petites différences affectent sa capacité d'adhésion. Il semblerait que les isolats UPEC lieraient avec plus d'affinité les récepteurs contenant des résidus monomannoses alors que les souches intestinales seraient plutôt limitées à une adhésion aux récepteurs avec résidus trimannoses (Bower *et al.*, 2005; Mulvey, 2002). Comme cette adhésine lie des récepteurs par le biais de résidus contenant du mannose, ces fimbriae sont dit « mannose-sensibles ». En effet, l'adhésion médiée par cette organelle peut-être neutralisée par la présence de mannose libre dans l'urine ou encore de protéines excrétées contenant des résidus de mannose comme la protéine Tamm-Horsfall qui se retrouve en forte concentration dans l'urine (Bower *et al.*, 2005; Saemann *et al.*, 2005). Ce type de neutralisation explique d'ailleurs la raison pour laquelle le jus de canneberges constitue un bon moyen de prévenir les IU. Celui-ci contient une bonne concentration de fructose et de proanthocyanidins qui peuvent se retrouver dans l'urine et ainsi diminuer le taux d'adhésion des UPEC médié par les fimbriae type 1 ainsi que par les fimbriae de type P (Raz *et al.*, 2004).

Récemment, il a été montré que FimH seul, en plus de son rôle dans l'adhésion, peut médier l'invasion cellulaire. La démonstration a été faite par l'internalisation de billes de latex enrobées de la protéine FimH par des lignées cellulaires épithéliales humaines de la vessie (Mulvey *et al.*, 2000). L'invasion médiée par FimH est dépendante de la machinerie cellulaire de l'hôte et du réarrangement du cytosquelette (Bower *et al.*, 2005; Martinez *et al.*, 2000). Le rôle des fimbriae type 1 dans la virulence a fait l'objet de

plusieurs études. L'une d'entre elles a fait la comparaison directe du taux d'infection de souches positives et déficientes pour cette adhésine chez l'humain et la souris. Dans une autre, des mutants dans l'opéron *fim* chez une souche UPEC ont été employés dans un modèle d'IU murin. Ces deux études suggèrent une virulence moindre chez une souche *fim*-négative (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002; Connell *et al.*, 1996).

1.4.2 Le fimbriae de type P

Les fimbriae de type P ont une structure similaire à celles des fimbriae de type 1 et sont codés par l'opéron *pap*. PapA compose la sous-unité de base qui forme le corps basal, trois protéines s'associent à l'adhésine PapG pour former l'extrémité; PapE, PapF et PapK. L'adhésine PapG reconnaît un groupe digalactoside lié à un résidu β -glucose attaché à la membrane eucaryote par une ceramide. Ce récepteur glycolipidique se retrouve à la surface des érythrocytes ainsi qu'à la surface des cellules rénales de l'hôte. La présence de cette adhésine chez les isolats cliniques est plus fortement liée à ceux provenant d'infections rénales qu'à ceux provenant de cystites (Johnson, 1991; Mulvey, 2002). Il existe trois variants de l'adhésine PapG; PapGI, II, III qui reconnaissent chacun respectivement une forme soit non-additionnée de N-acetyl-galactosamine du récepteur ou une forme mono ou di-N-acetyl-galactosamine. Il existe aussi plusieurs sérovariants de la sous-unité PapA chez différentes souches. Certains sérovariants sont plus associés à des isolats cliniques que d'autres (Johnson, 1991). Une étude a montré qu'un mutant de l'opéron *pap* chez une souche UPEC était incapable de causer une pyélonéphrite chez le singe, confirmant ainsi le lien entre cette adhésine et ce type d'infection (Roberts *et al.*, 1994).

1.4.3 Les fimbriae S/F1C

Les fimbriae de type S ont une structure également similaire avec une sous-unité qui forme le corps basale, SfaA, et quelques protéines associées à l'adhésine SfaS, c'est-à-dire SfaG et SfaH. Plusieurs fimbriae reliés génétiquement aux fimbriae de type S ont été identifiés, c'est le cas des fimbriae F1C. L'adhésine SfaS se lie à des résidus d'acides

sialiques sur des récepteurs de cellules endothéliales et du rein ainsi que sur l'uroplakine présente à la surface des cellules de la vessie (Johnson, 1991; Mulvey, 2002).

1.4.4 Les adhésines Afa/Dr

Cette famille d'adhésine regroupe trois adhésines fimbriaires ainsi que plusieurs adhésines afimbriaires. Ces adhésines sont toutes le produit d'au moins cinq gènes chaqu'une. Elles lient l'antigène sanguin Dr présent sur les molécules régulatrices CD55 et DAF exprimées par les érythrocytes et les cellules uroépithéliales. Il a été proposé que l'augmentation de l'expression du récepteur CD55 durant la grossesse pourrait être relié à l'augmentation du risque d'IU chez les femmes enceintes. Certaines de ces adhésines pourraient également avoir un rôle d'invasion cellulaire mais cette fonction reste à clarifier chez les UPEC (Bower *et al.*, 2005; Johnson, 1991; Mulvey, 2002).

1.5 Système de sécrétion de type III

Plusieurs bactéries gram-négative possèdent un complexe protéique nommé système de sécrétion de type III (SSTT) qui leur permet d'injecter à une cellule hôte des protéines effectrices pour moduler la machinerie cellulaire à leur avantage. Ces systèmes sont présents chez une multitude de bactéries pathogènes et comprennent, entre autre, des membres des genres *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* et *Escherichia* (Hueck, 1998). Ces systèmes nécessitent plus de 20 protéines pour former la base de la machinerie employée pour injecter les protéines effectrices. La base prend la forme d'une aiguille et les composantes formant l'aiguille sont en général assez conservées entre les différentes espèces. Par contre, les protéines effectrices des SSTT sont très diversifiées (Galan et Collmer, 1999; Hueck, 1998). Chez *Salmonella*, le SSTT permet d'enclencher l'invasion cellulaire. Ce type de système a grandement été étudié chez *Salmonella* et la mutation de plusieurs gènes clés importants pour la formation de l'aiguille du SSTT du SPI1 (*Salmonella* pathogeny island one) abolit le phénotype d'invasion cellulaire (Sukhan *et al.*, 2001). Il est à noter que *Salmonella* possède deux SSTT, un encodé sur le SPI1 qui est important pour l'invasion cellulaire et un second encodé sur le SPI2 qui serait impliqué

dans la survie à l'intérieur du phagosome (Hansen-Wester et Hensel, 2001). Chez les *E. coli* enteropathogéniques, un SSTT nommé LEE (locus of enterocyte effacement) est responsable des lésions cellulaires intestinales typiques nommées « attachement-effacement » (Clarke *et al.*, 2003). Malgré l'association de ce facteur de virulence avec plusieurs types d'*E. coli* pathogènes, les souches UPEC ne sont généralement pas associées à la présence de SSTT (Bower *et al.*, 2005).

1.6 L'acquisition du fer chez les UPEC

1.6.1 Le fer : importance, disponibilité et toxicité.

Le fer est un élément essentiel chez pratiquement tous les organismes vivants à quelques exceptions près (Andrews *et al.*, 2003; Raymond et Dertz, 2004). Il détient un rôle majeur dans plusieurs processus biologiques comme la photosynthèse, la méthanogénèse, la fixation de l'azote, la production et la consommation d'hydrogène, la respiration, le cycle de l'acide trichloroacétique, le transport de l'oxygène et la synthèse de l'ADN (Andrews *et al.*, 2003; McHugh *et al.*, 2003). Malgré ce rôle central et le fait que le fer soit un élément très abondant sur la planète, celui-ci est très peu disponible et possède un grand potentiel toxique (Andrews *et al.*, 2003).

En condition physiologique, on retrouve le fer sous deux formes; la forme réduite Fe^{2+} ou fer ferreux ainsi que la forme oxydée Fe^{3+} ou fer ferrique (Andrews *et al.*, 2003). Dû à la présence de l'oxygène dans notre milieu, la forme ferrique est prédominante. Comme cette forme du fer est extrêmement insoluble et sa concentration est de l'ordre de 10^{-9}M à pH 7.0, le fer est très peu disponible et est limitant pour la croissance des microorganismes dans la plupart des niches écologiques (Andrews *et al.*, 2003; Faraldo-Gomez et Sansom, 2003; Ratledge et Dover, 2000). Le potentiel toxique du fer vient du fait que celui-ci agit comme catalyseur dans une réaction nommée réaction de Haber-Weiss et qui mène à la formation de radicaux libres ($\cdot\text{OH}$). Cette réaction est la combinaison de la réaction d'oxydation du fer ferreux en fer ferrique, mieux connue sous le nom de réaction de Fenton (section de gauche de la Fig. 1.3) et de la réduction du fer

ferrique en fer ferreux (section de droite de la Fig. 1.3) (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000). Les radicaux libres sont très dommageables pour la cellule bactérienne puisqu'ils brisent l'ADN (Andrews *et al.*, 2003; Touati, 2000). Donc en présence d'oxygène, non seulement le fer est peu disponible, mais il est également toxique.

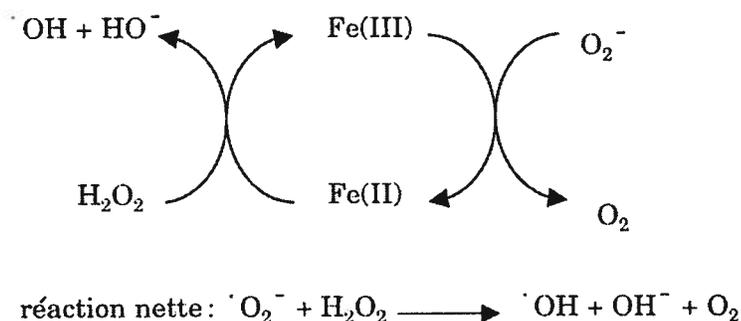


Fig. 1.3. Les réactions d'oxydation et de réduction du fer. Adapté de (Ratledge et Dover, 2000).

1.6.2 La séquestration du fer chez l'hôte

Comme le fer est un élément essentiel au fonctionnement biologique d'une cellule et que celui-ci est toxique, les organismes vivants ont dû développer des systèmes pour s'assurer un apport en fer constant tout en contrôlant sa toxicité. Chez les mammifères, ce contrôle se fait par la présence de protéines de hautes affinités pour le fer avec lesquelles celui-ci se complexe. Ces protéines séquestrent le fer à l'intérieur de l'organisme assurant ainsi un apport constant et empêchant la réaction toxique avec l'oxygène (Crichton *et al.*, 2002; Raymond *et al.*, 2003). Une des principales protéines responsables de cette fonction est une glycoprotéine monomérique extracellulaire nommée transferrine. Il y a trois classes majeures de transferrines; la transferrine du sérum, la lactotransferrine et l'ovotransferrine (ovalbumine) retrouvée dans l'albumen des œufs (Ratledge et Dover, 2000). Cette famille de protéines possède deux sites de liaison au fer avec une très grande constante d'affinité (de l'ordre de 10^{20}). La séquestration du fer intracellulaire est médiée par une protéine nommée ferritine ainsi que par des protéines employant le fer comme l'hémoglobine et l'hème (Crichton *et al.*, 2002; Litwin et Calderwood, 1993; Ratledge et Dover, 2000). La ferritine est une protéine de séquestration se retrouvant dans tout le

règne animal, végétal ainsi qu'en partie chez les microorganismes. Elle forme un complexe composé de 24 sous-unités protéiques qui sont capables de séquestrer jusqu'à 4500 atomes de Fe (Bullen *et al.*, 2005; Crichton *et al.*, 2002; Ratledge et Dover, 2000).

La présence de ces nombreuses protéines séquestrant le fer chez les mammifères diminue encore la concentration de fer disponible chez un hôte pour une bactérie, cette dernière est de l'ordre de 10^{-18} M (Bullen *et al.*, 2005; Raymond et Dertz, 2004; Litwin et Calderwood, 1993). Le fer est probablement le déterminant majeur pour la survie d'un pathogène chez son hôte car c'est le nutriment le plus difficile à acquérir dans ce milieu (Ratledge et Dover, 2000). Les bactéries pathogènes comme les UPEC ont dû développer différents systèmes leur permettant d'acquérir le fer nécessaire à leur croissance chez l'hôte malgré la faible disponibilité.

1.6.3 Les différents systèmes d'acquisition du fer chez les UPEC

Les bactéries pathogènes disposent de trois grandes stratégies pour acquérir le fer dont elles ont besoin pour leur croissance (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000):

- Synthèse, acquisition et utilisation des sidérophores
- Incorporation directe à partir des protéines de l'hôte
- Transport du fer ferreux

L'incorporation du fer par le biais de récepteurs bactériens reconnaissant directement les protéines séquestrant le fer chez l'hôte est une stratégie employée par de multiples pathogènes (Perkins-Balding D., 2004; Ratledge et Dover, 2000). Chez *E. coli*, ChuA est un récepteur qui peut lier directement l'hème et médier l'acquisition du fer. Cette acquisition est dépendante de la protéine TonB qui fournit l'énergie nécessaire (Payne et Mey, 2004; Torres et Payne, 1997). ChuA a également été identifié chez des souches UPEC (Nagy *et al.*, 2001; Oelschlaeger *et al.*, 2002b). Une souche UPEC mutante

uniquement pour ce récepteur ne semble pas montrer une diminution de virulence dans un modèle d'IU murin (Torres *et al.*, 2001).

Une autre stratégie est l'acquisition du fer ferreux. Tel que mentionné précédemment, celui-ci est beaucoup plus disponible que le fer ferrique. Les bactéries disposent de quelques systèmes permettant leur survie à partir de cette source de fer. Chez *E. coli*, il en existe deux principaux soit Feo et Sit. L'opéron *feo* comporte trois gènes *feoABC*, FeoB semble être la protéine ayant un rôle majeur dans l'incorporation du fer. Celle-ci se retrouve à la membrane interne et semble posséder une activité dépendante de l'hydrolyse GTP-GDP. FeoA et C sont des protéines cytoplasmiques. Le transport du fer ferreux par Feo est dépendant d'énergie mais indépendant de TonB. Cependant, le mécanisme reste encore à élucider (Hantke, 2004; Kammler *et al.*, 1993). Un autre système grâce auquel *E. coli* est capable d'incorporer le fer ferreux est le système Sit. Ce système est un transporteur d'ions de type ABC (ATP binding cassette) et est encodé par l'opéron *sitABCD*. Il a d'abord été identifié chez *Salmonella* (Zhou *et al.*, 1999). Il est présent chez plusieurs souches d'*E. coli* et *Shigella*, mais absent des souches d'*E. coli* K-12 (Runyen-Janecky *et al.*, 2003; Welch *et al.*, 2002). Ce système possède une affinité pour les ions bivalents et il transporte le Mn^{2+} ainsi que le Fe^{2+} (Boyer *et al.*, 2002; Kehres *et al.*, 2002)

1.6.4 Les sidérophores et leur machinerie

Les sidérophores sont des molécules de faible poids moléculaire possédant une très grande affinité pour le fer et qui sont excrétées dans le milieu par les bactéries (Andrews *et al.*, 2003). Ceux-ci vont aller s'approprier le fer contenu chez les protéines de l'hôte tel que la ferritine ainsi que les transferrines (Ratledge et Dover, 2000). Il existe trois grandes catégories de sidérophores, soient les catecholates, les hydroxamates ainsi que les hydroxycarboxylates (Raymond et Dertz, 2004). Leurs structures chimiques diffèrent, mais ils ont tous des points communs. Par exemple, ils possèdent un donneur d'atome (en général l'oxygène, parfois l'azote ou le soufre) et une très grande constante d'affinité pour le fer pouvant aller jusqu'à 10^{52} dans le cas de l'entérobactine (Raymond

et Dertz , 2004; Ratledge et Dover, 2000). Jusqu'à ce jour, plus de 500 différents sidérophores ont été identifiés (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000). Chez *E. coli*, l'entérobactine est le principal sidérophore, mais on en retrouve également d'autres. De plus, plusieurs souches possèdent la capacité d'employer des sidérophores produits par d'autres espèces, ce phénomène est nommé l'utilisation de xenosidérophores (Payne et Mey, 2004; Ratledge et Dover, 2000).

1.6.5 L'entérobactine et son transport

La molécule d'entérobactine fut isolée pour la première fois en 1970 pratiquement en même temps chez *E. coli* (O'Brien et Gibson, 1970) et chez *Salmonella* (Pollack et Neilands, 1970). C'est un sidérophore de type cathécolate qui est composé de trois groupes 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS) attachés par des liaisons esters (voir Fig. 1.4) (Raymond et Dertz, 2004; O'Brien et Gibson, 1970). Le fer se lie aux 6 groupements oxygène se trouvant à l'extrémité des groupements cathécoles (Raymond et Dertz, 2004; Raymond *et al.*, 2003). La biosynthèse de ce sidérophore se fait en deux étapes à partir d'une branche de la voie de synthèse des acides aminés aromatiques. Celle-ci nécessite la participation du produit des gènes *entDFCEBA*. Tout d'abord, EntC, EntB et EntA convertissent un précurseur d'acide aminé aromatique, l'acide chorismique, en 2,3-DHB. L'acide chorismique provient lui-même d'une autre voie métabolique, celle de l'acide shikimique (Roberts *et al.*, 2002). Ensuite, EntB, EntD, EntE et EntF catalysent la formation de l'entérobactine en condensant trois molécules de DHB ensemble. (Crosa et Walsh, 2002; Walsh et Marshall, 2004; Ratledge et Dover, 2000; Raymond *et al.*, 2003).

La synthèse de la molécule d'entérobactine se fait dans le cytoplasme et celle-ci ne peut être excrétée de façon passive à cause de sa charge et de sa taille. La protéine responsable de l'excrétion de ce sidérophore est EntS (Furrer *et al.*, 2002). Une fois excrétée, l'entérobactine se lie à un atome de fer ferrique et doit être captée et transloquée à l'intérieur de la bactérie. Dans le milieu extracellulaire, l'entérobactine peut se retrouver sous la forme de produits dégradés c'est-à-dire sous la forme de molécules de DHBS trimériques, dimériques ou monomériques. Le DHBS monomérique peut également

médier l'apport du fer à la bactérie, mais son affinité pour le fer est grandement inférieure à celle de l'entérobactine cyclique (Hantke, 1990). La capture du sidérophore chargé se fait par le biais de protéines de la membrane externe que l'on nomme récepteurs de sidérophore. Ceux-ci possèdent plusieurs caractéristiques :

- Une même fonction : capturer les sidérophores chargés
- Un domaine d'interaction avec la protéine TonB
- Une régulation transcriptionnelle médiée par la protéine Fur
- Ils confèrent parfois la susceptibilité aux colicines, microcines et phages

Pour le transport de l'entérobactine, le récepteur natif est FepA (Buchanan *et al.*, 1999; Lundrigan et Kadner, 1986). Cependant, d'autres récepteurs de sidérophore peuvent également médier son entrée. C'est le cas de IroN (Russo *et al.*, 2002; Sorsa *et al.*, 2003) ainsi que Fiu et Cir, ces deux derniers permettent cependant l'entrée des formes dégradées de l'entérobactine (Hantke, 1990; Nikaido et Rosenberg, 1990). Le passage de l'entérobactine chargée à l'espace périplasmique nécessite un transport actif utilisant la force protomotrice (voir Fig. 1.4). FepA interagit avec la protéine TonB. Cette dernière fait partie du complexe TonB-ExbB-ExbD. Ce complexe procure l'énergie nécessaire au changement conformationnelle de FepA pour relâcher l'entérobactine chargée dans l'espace périplasmique (Andrews *et al.*, 2003; Braun et Braun, 2002). Le complexe TonB est nécessaire à la translocation de tous les sidérophores connus chez *E. coli*. Il a déjà été prouvé que ce complexe est nécessaire à la virulence pour une souche UPEC dans un modèle murin (Torres *et al.*, 2001). Une fois dans l'espace périplasmique, l'entérobactine chargée est prise en charge par la protéine FepB. Celle-ci agit comme navette et transporte l'entérobactine chargée du récepteur FepA au complexe de transport ABC FepCDG (Andrews *et al.*, 2003; Sprencel *et al.*, 2000; Stephens *et al.*, 1995). FepCDG forme une perméase de type ABC située à la membrane interne. Cette dernière permet la translocation finale de l'entérobactine chargée vers le cytoplasme en employant l'énergie fournis par l'ATP (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000; Raymond *et al.*, 2003). Une fois dans le cytoplasme, l'entérobactine chargée va être hydrolysée par l'estérase Fes qui dégrade les liens esters et libère le fer dans le cytoplasme (Andrews *et al.*, 2003;

Brickman et McIntosh, 1992). Une fois dans le cytoplasme, le fer peut être employé dans diverses fonctions ou encore être conservé pour usage ultérieur par les protéines bactériennes de séquestration du fer soient les protéines Dbs, ferritine ou bactoferritine (Andrews *et al.*, 2003).

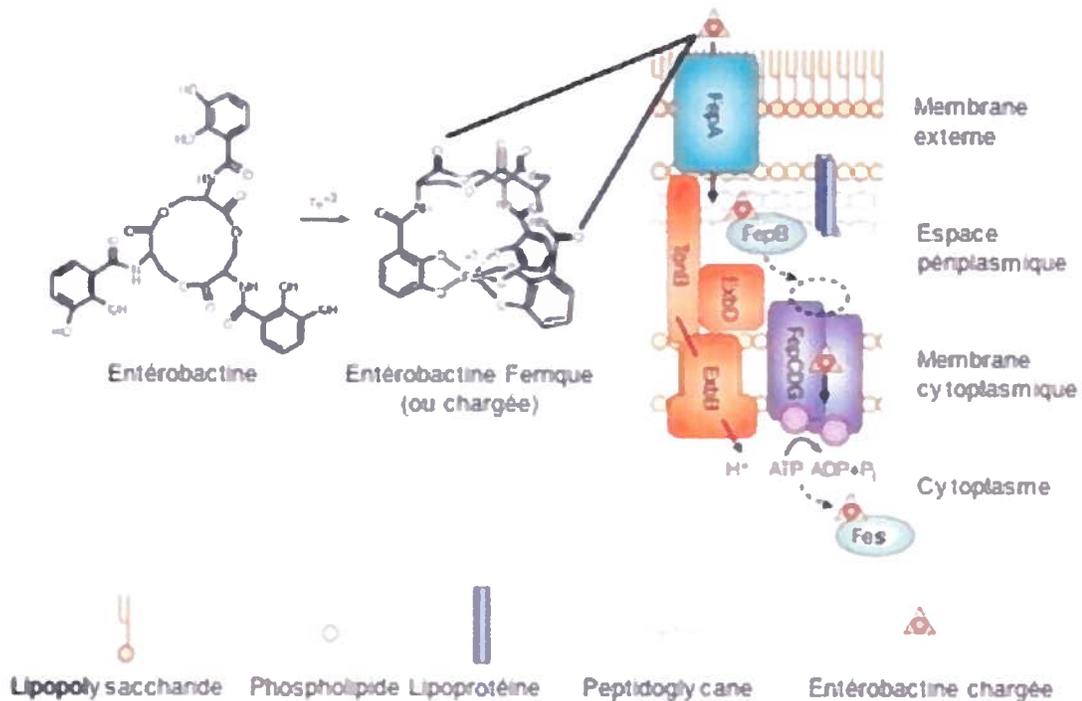


Fig. 1.4. La structure de l'entérobactine ainsi que la machinerie impliquée dans sa translocation vers le cytoplasme : FepA est le récepteur dépendant de l'énergie fournie par le complexe TonB-ExbB-ExbD, FepB est une navette, FepCDG forme une perméase et Fes libère le fer dans le cytoplasme. Adapté de (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003) et de (Crosa et Walsh, 2002).

La spéculation sur le rôle possible de l'entérobactine dans la virulence a donné lieu à de nombreuses études. Dans le modèle de l'IU chez la souris avec une souche UPEC, il a été démontré qu'un mutant dans la production d'entérobactine n'était pas atténué (Torres *et al.*, 2001). La souche employée contient plusieurs autres systèmes d'acquisition du fer pouvant compenser cette perte. Le système de captation du fer par l'entérobactine se retrouve d'ailleurs chez la plupart de souches d'*E. coli* autant commensale que pathogène (Demir et Kaleli, 2004).

1.6.6 Les autres sidérophores d'*E. coli*

Contrairement à l'entérobactine, les autres systèmes de production et de capture de sidérophore retrouvés chez *E. coli* sont fortement associés aux souches pathogènes. Un des principaux est celui de l'aérobactine, c'est un sidérophore de type hydroxamate. Celui-ci est produit à l'aide des protéines codées par les gènes *iucABCD* et son récepteur est *iutA*. Encore une fois, un mutant simple pour ce système chez une UPEC ne semble pas être atténué (Torres *et al.*, 2001). Les salmochelines sont un autre type de sidérophore. Cette molécule est dérivée de l'entérobactine et la modification de celle-ci, son transport, et son hydrolyse sont médiés par les produits de l'opéron *iroBCDEN* (Hantke *et al.*, 2003; Payne et Mey, 2004). Un mutant du récepteur *IroN* semble d'ailleurs être atténué chez une souche UPEC dans un modèle d'IU murin (Russo *et al.*, 2002). Des études de prévalence ont démontré que le système d'aérobactine et le système *iro* sont plus fortement associés aux UPEC qu'aux isolats commensaux (Bauer *et al.*, 2002; Demir et Kaleli, 2004; Johnson, 1991; Johnson *et al.*, 2000b; Johnson *et al.*, 2005b). Yersiniabactine, qui est un système de production et de capture de sidérophore produit par *Yersinia*, est un autre exemple de sidérophore retrouvé chez les souches UPEC (Johnson *et al.*, 2005b; Payne et Mey, 2004; Ratledge et Dover, 2000). Les systèmes présentés ici sont les principaux, il en existe d'autres et plusieurs restent à découvrir. L'aspect de la redondance des systèmes de capture des sidérophores est développé dans l'article (voir section 3.2.5).

1.6.7 Les colicines

Plusieurs phages, microcines et colicines utilisent les récepteurs de sidérophore comme point d'entrée chez la bactérie (Raymond *et al.*, 2003). Les colicines sont des exoprotéines bactériennes sécrétées par *E. coli* tuant les bactéries avoisinantes qui possèdent leurs récepteurs. Les colicines du groupe B nécessitent un récepteur ayant une interaction avec la protéine *TonB* pour pouvoir être transloquées et avoir un effet toxique. Certaines forment un pore dans la membrane et déséquilibrent la cellule bactérienne tandis que d'autres s'attaquent à la synthèse protéique ou encore à la synthèse du LPS.

Parmi les colicines formant des pores, on retrouve la colicine « B » qui cible le récepteur FepA et la colicin « Ia » qui cible le récepteur Cir (Braun *et al.*, 2002; Cao et Klebba, 2002).

1.6.8 Importance *in vivo* des systèmes d'acquisition du fer

Tel que stipulé à quelques reprises dans les paragraphes précédents, un simple mutant dans un des systèmes d'acquisition du fer n'est souvent pas atténué dans un modèle d'infection animal. Par contre, la combinaison de mutations de plusieurs de ces systèmes conduit à une diminution de la virulence (Torres *et al.*, 2001). Plusieurs de ces systèmes semblent fortement exprimés lors de l'infection urinaire tel que récemment démontré lors d'une étude transcriptionnelle (Snyder *et al.*, 2004). Ceci met en évidence leur importance ainsi que la condition de stress, en ce qui concerne le fer, lors d'une infection urinaire.

1.7 Autres facteurs de virulences associées aux UPEC

1.7.1 Le « Cytotoxic necrotising factor 1 » (CNF1)

CNF1 est une toxine sécrétée associée à environ le tiers des isolats d'IU (Bower *et al.*, 2005). Elle pénètre dans la cellule eucaryote et elle stimule la formation de fibres d'actine de stress, de lamellipodes, filopodes ainsi que d'ondulations membranaires. Ceci est dû à son action de deamidase, qui convertit les résidus glutamines sur des GTPases Rho en acides glutamiques ayant pour effet de rendre les GTPases Rho actives de façon constitutive. Comme ces GTPases jouent un rôle clé dans la régulation d'une variété de processus cellulaires dont la réorganisation de l'actine, cette dérégulation déstabilise l'équilibre du cytosquelette cellulaire (Boquet, 2001; Bower *et al.*, 2005). Plusieurs autres activités sur la cellule hôte associées à cette toxine ont été rapportées. Il reste à découvrir comment cette toxine est excrétée et quel est son récepteur à la surface de la cellule hôte. Le rôle *in vivo* du CNF1 chez les UPEC est également à élucider. Fait-elle la promotion de l'apoptose ou facilite-t-elle l'invasion cellulaire? (Boquet, 2001) Certaines études ont

réussi à montrer qu'un mutant *cnf1*- était atténué chez une souche UPEC dans un modèle d'IU murin alors que d'autres n'y ont vu aucun effet (Johnson *et al.*, 2000a; Rippere-Lampe *et al.*, 2001). Le rôle de CNF1 chez les UPEC reste donc à déterminer (Oelschlaeger *et al.*, 2002b).

1.7.2 L' α -hémolysine

L' α -hémolysine est une toxine sécrétée par un certain nombre d'UPEC. Celle-ci est encodée à l'intérieur d'un opéron de quatre gènes mais seul HlyA est exportée. HlyBCD servent à l'activation et la sécrétion de la toxine. HlyA lyse les érythrocytes de tous les mammifères par la formation de pores dans la membrane de la cellule. Cette toxine possède un domaine de liaison dépendant de la présence de calcium. Une fois insérée dans la membrane, une seule unité de HlyA est suffisante pour former un pore qui augmente la perméabilité membranaire des érythrocytes au Ca^{2+} , K^{+} , mannitol et sucrose (Johnson, 1991; Stanley *et al.*, 1998). La toxicité de l' α -hémolysine ne se limite pas aux érythrocytes mais également à une multitude de types cellulaires (Stanley *et al.*, 1998). Une étude récente montre cependant que dans un modèle de pyélonéphrite *in vivo* chez le rat, l' α -hémolysine aurait plutôt un rôle proinflammatoire sans lyser les cellules puisque la toxine se retrouverait à une concentration sous-létale pour les cellules (Uhlen *et al.*, 2000). Quelques études ont démontré l'importance de cette toxine pour la virulence dans le modèle murin soit par voie intrapéritonéale (Hacker *et al.*, 1983) et par voie d'IU ascendante (Marre *et al.*, 1986).

1.7.3 Les autotransporteurs

Les autotransporteurs sont des protéines caractérisées par trois domaines : un peptide signal, un domaine passager et une unité de translocation. Ces protéines sont excrétées par le système de sécrétion de type V sous leur propre action. Tout d'abord, le peptide signal dirige la sécrétion via le système *sec* puis celui-ci est clivé et la protéine se retrouve dans l'espace périplasmique. Ensuite l'unité de translocation s'insère dans la membrane externe et forme un pore par lequel est excrété le domaine passager. Ce dernier

peut finalement être clivé pour se retrouver dans le milieu extracellulaire ou encore rester lié à la membrane externe. Le domaine passager est la section de la protéine avec une fonction active, ces fonctions peuvent être multiples (adhésion, protéase, toxine...) (Desvaux *et al.*, 2004; Henderson et Nataro, 2001; Henderson *et al.*, 2004). Chez la souche UPEC archétype CFT073, 10 autotransporteurs ont été identifiés par voie bioinformatique (Parham *et al.*, 2004), cependant seulement trois ont fait l'objet d'études plus poussées. Il s'agit de PicU pour lequel une fonction de mucinase a été démontrée (Parham *et al.*, 2004), Sat qui démontre une activité toxique par la formation de vacuole chez les cellules épithéliales humaines de la vessie et du rein (Guyer *et al.*, 2000; Guyer *et al.*, 2002) et Vat pour lequel un homologue à 98% (au niveau de la séquence nucléique) a été décrit chez une souche d'*E. coli* pathogène aviaire comme ayant une activité cytotoxique vacuolaire sur des cellules de fibroblaste d'embryon de poulet (Parreira et Gyles, 2003). Ces trois autotransporteurs montrent une plus grande prévalence chez les isolats d'IU ou de pyélonéphrites par rapport aux souches fécales commensales (Guyer *et al.*, 2000; Guyer *et al.*, 2002; Heimer *et al.*, 2004). Jusqu'à maintenant, des mutants d'autotransporteurs chez les UPEC n'ont pas montré d'atténuation en terme du nombre de bactéries retrouvées dans les organes ni pour *pic* ni pour *sat*. Par contre, une différenciation en terme des lésions présentées sur des coupes histologiques a été remarquée pour un mutant *sat* (Guyer *et al.*, 2000; Guyer *et al.*, 2002; Heimer *et al.*, 2004). Pour *vat*, une atténuation de virulence chez un mutant d'une souche aviaire a été remarquée chez le poulet (Parreira et Gyles, 2003).

1.7.4 Résistance à la phagocytose et au sérum

Le complément et la phagocytose sont deux mécanismes de défense du système immunitaire de l'hôte qui ont pour but d'éliminer les bactéries pathogènes. Dans le sérum, le complément lyse les bactéries. Celui-ci est composé d'une série de protéines qui interagissent ensemble pour former des pores dans la membrane bactérienne déstabilisant ainsi l'équilibre osmotique de la bactérie. La phagocytose des bactéries se fait par des cellules immunitaires tels les leucocytes, monocytes et macrophages. Suite à la phagocytose, les bactéries sont rapidement éliminées par ces cellules (Goldsby *et al.*,

2001; Johnson, 1991). Deux principaux éléments seraient responsables de la résistance bactérienne à ces moyens de défense de l'hôte : la présence d'exopolysaccharides capsulaires et du lipopolysaccharide « LPS », tous deux situés sur la membrane externe de la bactérie. Ces deux mêmes éléments sont à la base de la classification sérologique de *E. coli* (voir section 1.9.5). La capsule augmenterait la résistance aux cellules phagocytaires et elle augmenterait la résistance au complément probablement en masquant des composantes de la surface bactérienne (Burns et Hull, 1999; Horwitz et Silverstein, 1980; Johnson, 1991; Vermeulen *et al.*, 1988). Le LPS semble également avoir un rôle à jouer dans la résistance au complément (Burns et Hull, 1999; Johnson, 1991; Vermeulen *et al.*, 1988). Par contre ce dernier fait également la promotion d'une réponse inflammatoire chez l'hôte (Johnson, 2003; Trent, 2004). L'idée que la capsule et le LPS aient un rôle dans la virulence est également soutenue par une récente étude de transcriptome d'une souche UPEC et qui montre une régulation à la hausse des gènes nécessaires à la synthèse de ces composantes suite à un passage *in vivo* dans un modèle d'IU chez la souris (Snyder *et al.*, 2004). Il existe plusieurs variants antigéniques de capsule et de LPS et certaines combinaisons sont plus souvent associées à des souches virulentes que d'autres (Johnson, 2003). Quelques autres protéines de la membrane externe comme TraT et Iss jouent également un rôle dans la résistance au sérum (Johnson, 1991; Pramoonjago *et al.*, 1992).

1.8 La régulation de l'expression des facteurs de virulence

L'expression des facteurs de virulence n'est pas constitutive et elle est souvent réprimée lorsque ceux-ci ne sont pas nécessaires pour la survie et la croissance (Harel et Martin, 1999). D'ailleurs, une des principales stratégies pour identifier les gènes de virulence est basée sur le fait qu'ils ne sont pour la plupart pas exprimés en milieu de culture riche *in vitro* (Handfield et Levesque, 1999). La régulation empêche une dépense énergétique inutile et assure une expression uniquement lorsque les conditions l'exigent (Emody *et al.*, 2003). Cette tactique permet également de contrôler sa « visibilité ». Par exemple, comme les récepteurs de sidérophore sont les points d'attachement des bactériophages et colicines, une expression inutile de ceux-ci rend la bactérie plus

susceptible à ces deux facteurs nuisibles. Il en va de même pour la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte (Harel et Martin, 1999).

1.8.1 Les régulateurs globaux

Lorsqu'une bactérie pathogène se retrouve à l'intérieur de l'hôte, les conditions environnementales changent dramatiquement et la bactérie modifie son profil d'expression en fonction des stimuli extérieurs. Pour les UPEC, lorsqu'elles se retrouvent dans le système urinaire, ces stimuli sont : une concentration en fer et en azote limitante, une condition d'oxygénation moyenne, un faible pH et une osmolarité élevée (Snyder *et al.*, 2004). La régulation au niveau transcriptionnelle, c'est-à-dire au niveau de la transcription d'un gène en ARNm, se fait de différentes façons. Parmi celles-ci, on retrouve : les régulateurs globaux comme les facteurs de transcription sigma, les protéines agissant sur la structure de l'ADN ainsi que les protéines ou les petites molécules répressives d'expression. RpoS est un exemple d'un facteur de transcription sigma associé au contrôle de gènes de virulence. Celui-ci lie le promoteur, remplace le facteur de transcription sigma 70 classique, recrute l'ARN polymérase et active la transcription de plus de 50 gènes reliés aux conditions de stress ou de phase stationnaire (Harel et Martin, 1999; Loewen *et al.*, 1998). La protéine H-NS est un excellent exemple de protéine agissant au niveau de la conformation de l'ADN pour réguler l'expression de facteurs de virulence. C'est une protéine de type histone qui compacte l'ADN et lui insère du surenroulement négatif. Le mécanisme par lequel la régulation d'expression se fait n'est pas clair. Cependant, on sait que cette protéine est impliquée dans la régulation de plusieurs fimbriae dont les fimbriae S, type 1 et P (Harel et Martin, 1999). Fur est un exemple de protéine qui exerce une régulation négative en bloquant l'accès de la région promotrice d'un gène à l'ARN polymérase (Escolar *et al.*, 1999). Le ppGpp est un exemple de petite molécule ayant un effet régulateur sur la transcription. Il interagit directement avec l'ARN polymérase et la déstabilise (Magnusson *et al.*, 2005). La régulation au niveau de la transcription est de façon directe ou indirecte par le biais d'autres protéines ayant elles-mêmes une expression régulée par ces différents moyens. La régulation peut également se faire au niveau de la stabilité de l'ARNm par les petits

ARN régulateurs. Ceux-ci peuvent stabiliser l'ARNm ou encore faire la promotion de sa dégradation. Les petits ARN régulateurs semblent également pouvoir moduler l'expression au niveau transcriptionnelle (Storz *et al.*, 2005). La régulation de l'expression peut également avoir lieu au niveau protéique c'est-à-dire au niveau de l'efficacité traductionnelle et de la stabilité post-traductionnelle (Holmes et Jobling, 1996).

1.8.2 Le cas de régulation des fimbriae

Chez *E. coli*, l'expression des fimbriae est sujette à un phénomène que l'on nomme variation de phase, c'est-à-dire que dans une population donnée, sous des conditions données, seul un certain pourcentage des bactéries vont exprimer les fimbriae alors que les autres ne les exprimeront pas. Les fimbriae de type 1 et les fimbriae de type P sont deux bons exemples de cette régulation de type « on/off » (Harel et Martin, 1999; Holden et Gally, 2004; van der Woude et Baumler, 2004).

1.8.3 Le régulateur Fur

Fur pour « Ferric uptake regulator » est une protéine homodimère qui réprime l'expression de gènes impliqués dans le transport du fer. Elle est également impliquée dans la régulation de l'expression de facteurs de virulence qui sont exprimés différenciellement en fonction concentration de fer (Escobar *et al.*, 1999). Au total, il est reconnu pour être impliqué dans la régulation de plus de 90 gènes (Andrews *et al.*, 2003). Lorsque le fer est en quantité suffisante dans la cellule bactérienne, Fur est lié au Fe^{2+} et peut interagir avec l'ADN. En absence de fer, Fur n'est pas lié au Fe^{2+} et ne possède pas la conformation nécessaire pour son interaction avec l'acide nucléique (voir Fig. 1.5). Fur se lie sur l'ADN à une séquence nommée Fur box, qui est une séquence consensus plus ou moins conservée (ce point est discuté en plus de détails dans l'article). Cette région se trouve près de la région promotrice d'un gène et la liaison de Fur empêche l'attachement de l'ARN polymérase et donc son expression (Andrews *et al.*, 2003; Escobar *et al.*, 1999; Lorenzo de V., 2004).

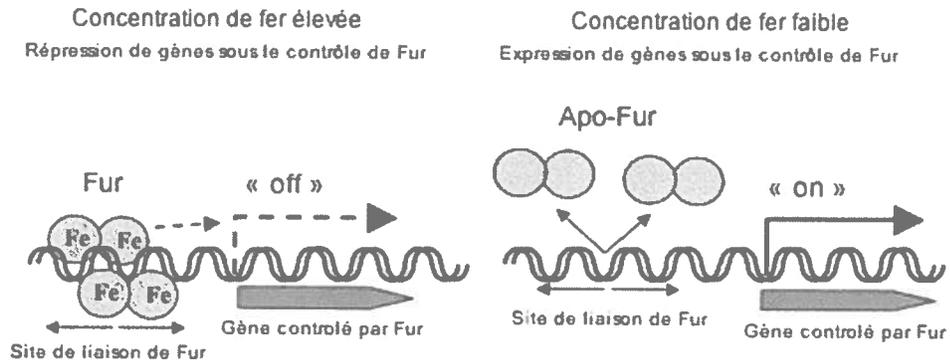


Fig. 1.5. La régulation par la protéine Fur. Lorsque le fer est en quantité suffisante celle-ci est complexée avec le Fe^{2+} , se lie à la région promotrice d'un gène sous son contrôle régulateur et empêche son expression. En conditions de fer limitante, Fur n'est pas lié au Fe^{2+} et l'expression du gène est déréprimée. Adaptée de (Andrews *et al.*, 2003).

1.9 La diversité d'*E. coli*

E. coli est une bactérie très diversifiée comprenant des souches non-pathogènes ainsi que des souches causant différents types de maladies. Les souches non-pathogènes ne possèdent pas les facteurs de virulence décrits précédemment, elles ont par conséquent un bagage génétique différent des souches pathogènes.

1.9.1 Le génome

Le génome représente l'ensemble du matériel génétique d'une souche bactérienne. À ce jour 5 génomes complets de souches d'*E. coli* sont disponibles dans les banques de données, deux commensales K-12, deux EHEC O157:H7 et une UPEC CFT073 ainsi que 3 génomes incomplets; une autre commensale K-12, une EAEC et une EPEC (Chaudhuri *et al.*, 2004). Il y a également d'autres génomes qui sont en cours de séquençage ou ne sont pas encore disponibles, c'est le cas d'une souche de méningite néonatale (Blattner, 2004) ainsi que d'une autre UPEC; 536 (Hacker *et al.*, 2004). Le séquençage de ces souches a montré que le contenu et la taille de leurs génomes varient considérablement. Le génome d'une souche commensale K-12 fait environ 4.6 Mb (Blattner *et al.*, 1997) alors que celui d'une souche EHEC O157:H7 a une longueur de 5.5 Mb. Il y a environ 4.1 Mb chez le génome des souches O157:H7 qui est homologue à ce qui se retrouve chez la souche commensale et qui semble être un « squelette commun » alors que 1.4 Mb d'ADN supplémentaire constitue de l'acquisition de matériel génétique supplémentaire (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001). Ce matériel génétique additionnel représente de l'information pouvant coder pour des facteurs permettant à la souche de causer une infection.

L'ajout du génome de la souche UPEC CFT073, qui possède un génome de 5.2Mb, au tableau des comparaisons met en évidence non seulement l'addition de matériel génétique chez une souche pathogène mais également la différence entre les souches pathogènes associées à diverses maladies (Welch *et al.*, 2002). En effet, la comparaison de ces trois génomes souligne la très grande variabilité en plus de réduire la

quantité de gènes communs entre ces souches d'*E. coli* (voir Fig. 1.6). Cette réduction du « corps central » du génome d'*E. coli* a été mise en évidence dans d'autres études où plusieurs isolats autant fécaux que pathogènes ont été comparés avec le génome de deux souches commensales. Il a été établi que le « squelette commun » de *E. coli* comporte entre 2800 et 3100 gènes sur les 4300 que possède une souche K-12 non-pathogène (Dobrindt *et al.*, 2003; Fukuya *et al.*, 2004). En plus de la différence marquée entre une souche commensale par rapport à une souche pathogène et de celle entre des souches pathogènes causant différentes maladies, il existe une grande variabilité entre des souches causant un même type d'infection (Welch *et al.*, 2002).

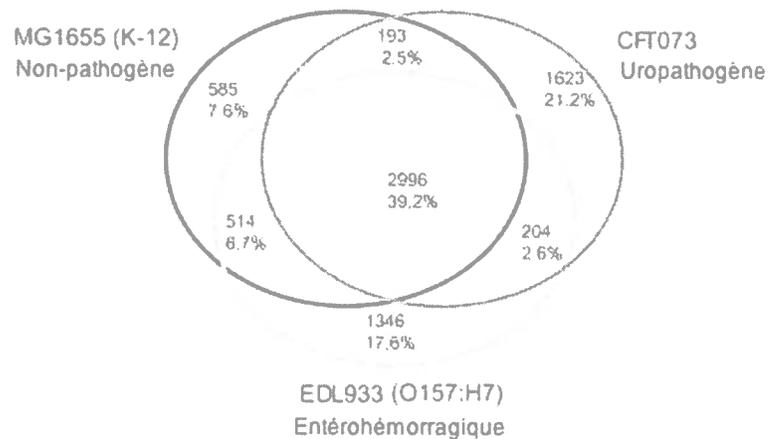


Fig. 1.6. Diagramme montrant les différences en terme du nombre de protéines prévues sur le génome de trois souches d'*E. coli*, une non-pathogène MG1655, une EHEC EDL933 et une UPEC CFT073. Adaptée de (Welch *et al.*, 2002)

1.9.2 L'acquisition de matériel génétique supplémentaire

Les souches pathogènes contiennent plusieurs facteurs de virulence encodés par des portions d'ADN non-présentes chez les souches commensales. Cette acquisition distincte de matériel génétique est connue sous le nom de transfert horizontal de gènes. Les premières évidences de ce transfert horizontal de gènes sont apparues dans les années 50 avec l'émergence de la résistance aux antibiotiques qui ne pouvait être expliquée par de simples mutations aléatoires (Ochman *et al.*, 2000). Ce mode de transfert génétique

semble avoir eu un rôle prédominant dans l'évolution d'espèces bactériennes. La différenciation entre *E. coli* et *Salmonella* il y a environ 100 à 150 millions d'années en est un bon exemple (Lawrence et Ochman, 1998; Wain *et al.*, 2001). Les fragments d'ADN incorporés proviennent d'autres espèces bactériennes ou encore de phages intégrés au chromosome (prophage). Ils contiennent des gènes de virulence ou permettant un métabolisme général différent connu chez d'autres espèces bactériennes, des cadres de lecture ouvert non-connus ou encore des facteurs de virulence associés à des phages (souvent des toxines) (Dozois et Curtiss, 1999; Ochman *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 2002a).

1.9.3 Les îlots de pathogénicité

On nomme ces portions d'ADN intégrées au génome des souches pathogènes PAI pour « pathogenicity islands ». Les PAI se distinguent du reste du génome par un contenu en Guanine-Cytosine (G-C) divergeant et par un usage différent des codons par rapport au reste du chromosome. Cette distinction est due à la provenance extérieure de ce matériel génétique (Dozois et Curtiss, 1999; Ochman *et al.*, 2000; Oelschlaeger *et al.*, 2002a). L'ADN qui formera un PAI entre dans une bactérie et s'insère dans le chromosome de trois différentes façons : par transformation, conjugaison ou transduction. La transformation est l'incorporation d'ADN libre du milieu par recombinaison homologue. La conjugaison est le transfert d'ADN plasmidique d'une souche à une autre qui peut par la suite s'intégrer au chromosome et finalement, la transduction se fait par le biais des phages. De plus l'intégration du matériel génétique peut se faire par l'entremise d'éléments mobiles autointégrant comme les transposons et les intégrons (Jain *et al.*, 2002; Ochman *et al.*, 2000). Ces modes d'insertion de l'ADN laissent également des traces indicatrices du transfert horizontal des PAI c'est-à-dire des gènes codant pour des intégrases, des éléments mobiles IS ou des transposases. De plus, plusieurs PAI sont typiquement associés à des ARNt et avec des séquences répétées aux extrémités. En effet, les ARNt représentent un endroit de choix pour l'insertion de ces éléments par les bactériophages puisque ceux-ci sont très conservés parmi les divers espèces bactériennes (Dozois et Curtiss, 1999; Lawrence et Ochman, 1998; Oelschlaeger *et al.*, 2002a).

Comme les PAI ont une origine externe, ces éléments sont parfois instables et peuvent être délétés partiellement ou entièrement suite à la rencontre de différentes conditions ou de pressions sélectives (Johnson *et al.*, 2003; Middendorf *et al.*, 2004). Plusieurs PAI ont été identifiés et associés à la présence de nombreux facteurs de virulence chez les UPEC ; CFT073 (Guyer *et al.*, 1998; Rasko *et al.*, 2001), J96 (Swenson *et al.*, 1996) et 536 (Oelschlaeger *et al.*, 2002a).

1.9.4 La clonalité chez *E. coli*

On peut qualifier la diversité d'*E. coli* de « population clonale ». Les clones se sont établis au cours de l'évolution suite à différentes pressions à partir d'une origine commune et possèdent des caractères génétiques distincts. Cette évolution continue de se faire par l'acquisition et la délétion de matériels génétiques à partir du « squelette de base » du génome d'*E. coli* (Dougan *et al.*, 2001; Ochman et Selander, 1984a; Vaisanen-Rhen *et al.*, 1984). On peut définir les différents clones chez *E. coli* de plusieurs façons. Premièrement, en utilisant une combinaison de méthodes génotypiques et phénotypiques c'est-à-dire : le typage séquentiel de locus multiples (MLST), l'électrophorèse enzymatique multilocus, le gel ADN d'électrophorèse à champs pulsés et le sérotypage. On peut également les classer en fonction de l'hôte qu'ils colonisent, la maladie qu'ils causent, les facteurs de virulence qui lui sont associés ou encore avec le type d'interaction qu'ils possèdent avec les cellules eucaryotes en culture (Dougan *et al.*, 2001; Foxman et Riley, 2001). En général, une certaine corrélation peut être faite entre ces diverses techniques pour associer un ou quelques clones pathogènes possédant un certain nombre de facteurs de virulence caractéristiques à un type de maladie ou à une épidémie. Plusieurs études ont démontré cette association entre la prédominance d'un ou quelques clones et une maladie ou encore une épidémie et ce pour le cas d'infection urinaire comme pour d'autres infections causées par *E. coli*. (Manges *et al.*, 2001; Maslow *et al.*, 1995; Prats *et al.*, 2000; Vaisanen-Rhen *et al.*, 1984; Wells *et al.*, 1983).

Le classement d'*E. coli* selon le type de maladie, l'hôte et l'interaction avec les cellules eucaryotes en culture a été discuté plus tôt dans la première section 1.1.

1.9.5 Le sérotypage

La classification sérologique a été introduite dans les années 1940 par le Dr. Kauffman. Elle est basée sur les différences de trois antigènes de surface soit l'antigène O, K et H (Whitfield et Roberts, 1999). L'antigène O fait partie du lipopolysaccharide (LPS), celui-ci tapisse la paroi externe de la bactérie. Il est composé de trois sections. La première est le lipide A qui est la section se retrouvant dans la membrane et à laquelle est associée les propriétés endotoxiques du LPS. La deuxième est le « core-OS » qui est composé d'oligosaccharides. Enfin, la section « O-PS » forme l'antigène O détecté par le sérotypage, elle est une répétition de polysaccharides et se trouve à la partie la plus distale du LPS (Heinrichs *et al.*, 1998; Trent, 2004). L'antigène K est forme la capsule et il est composé de polysaccharides (Johnson, 1991; Whitfield et Roberts, 1999). L'antigène H se retrouve sur les flagelles. Les flagelles sont de longs filaments tubulaires formés de la sous-unité flagelline et servent à la motilité (Ratiner *et al.*, 2003). Il existe une très grande variabilité de ces antigènes chez *E. coli*, 167 antigènes O, plus de 80 antigènes K et plus de 50 antigènes H ont été identifiés et quelques milliers de combinaisons sérologiques ont été répertoriées (Caugant *et al.*, 1985; Whitfield et Roberts, 1999).

1.9.6 La distribution phylogénétique et la collection ECOR

En 1984, Selander et Ochman ont mis sur pied une collection de 72 souches d'*E. coli* issues de divers mammifères et de divers endroits à travers la planète pour représenter la diversité d'*E. coli*. Ils ont choisi ces souches parmi une collection de 2600 isolats afin d'avoir une diversité non seulement de provenance mais également pour l'allèle de 11 enzymes (Ochman et Selander, 1984b). Par la suite, la distribution phylogénétique de cette collection a été établie à l'aide de la technique MLEE « multilocus enzyme elctrophoresis » (Herzer *et al.*, 1990). Cette technique est basée sur la migration différentielle d'enzymes sur gel d'électrophorèse en fonction des différences alléliques qui se manifestent par une séquence en acides aminées différente de la protéine (Selander *et al.*, 1986). Pour classer la collection ECOR, les variants de 38 enzymes ont été observés (Herzer *et al.*, 1990). Par la suite, le classement par la technique MLEE a été

confirmé par diverses études basées sur le séquençage de gènes conservés (multilocus sequence typing) (Boyd *et al.*, 1994; Nelson *et al.*, 1991; Nelson et Selander, 1992), par RFLP (restriction fragment length polymorphism) (Picard *et al.*, 1999) ainsi que par une technique de PCR multiplex (Clermont *et al.*, 2000). La figure 1.7 montre la phylogénie de *E. coli* par le biais de l'ECOR collection, un peu comme son arbre généalogique. On peut voir que *E. coli* y est divisé en quatre grands groupes, soit A, B1, B2 et D. Dans la collection ECOR comme dans la diversité générale d'*E. coli*, le groupe A et le groupe B1 représentent des souches commensales, pour A ce sont principalement des souches commensales K-12 isolées de l'humain alors que les souches B1 ont été isolées de mammifères autres que les primates (Herzer *et al.*, 1990; Picard *et al.*, 1999). Le groupe B2 est le groupe le plus associé aux facteurs de virulence et celui qui diverge le plus des autres groupes en terme de souches pathogènes. Le groupe D comporte également des souches non-commensales et est aussi associé à la présence de facteurs de virulence mais de façon moins prédominante que le groupe B2 (Johnson *et al.*, 2001; Picard *et al.*, 1999). Il y a également un cinquième groupe, le groupe E, qui représente des souches non-classées (Herzer *et al.*, 1990). La collection ECOR et ce mode de classement phylogénétique est grandement employé comme référence dans diverses études de criblage de gènes ou lors d'études de la diversité d'*E. coli* dans un milieu donné ou un type d'infection spécifique (exemple : (Amor *et al.*, 2000; Gordon *et al.*, 2005; Ren *et al.*, 2004; Zhang *et al.*, 2002)).

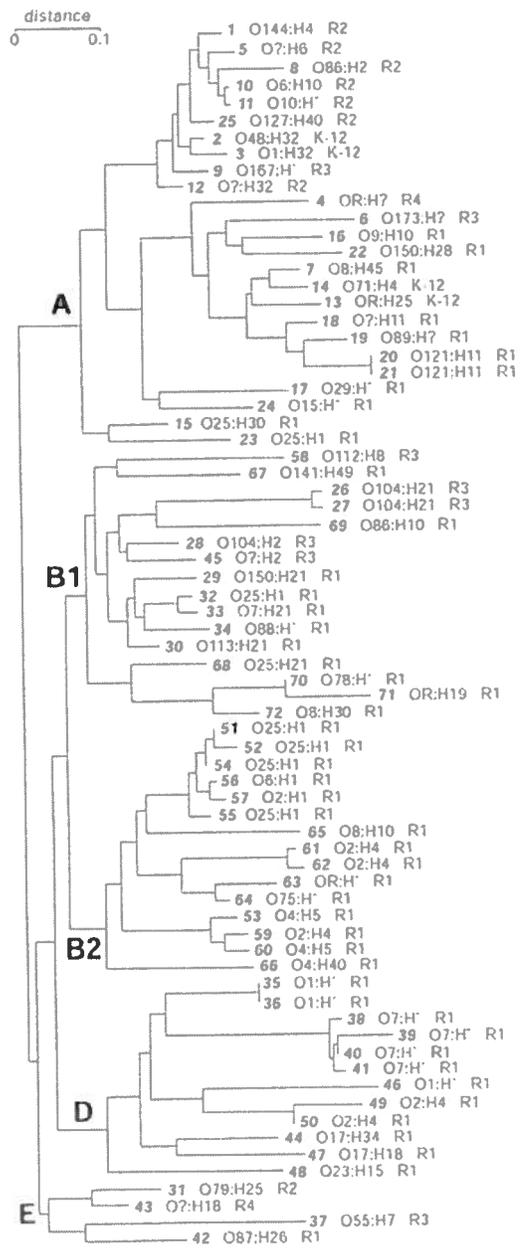


Fig. 1.7. La collection ECOR telle que classée par MLEE représentant la classification phylogénétique d'*E. coli*. Le sérotype des souches membres de la collection est indiqué. Tirée de (Amor *et al.*, 2000).

1.9.7 Le groupe clonal A

En 2001, Manges *et al.* ont identifiés un groupe clonale d'*E. coli* uropathogène responsable d'une épidémie d'IU en Californie, au Minnesota et au Michigan (Manges *et al.*, 2001). Ce groupe a été nommé groupe clonal A (CGA) et il est caractérisé par :

- Un patron de facteurs de virulence particulier, marqué par l'absence de plusieurs facteurs typiquement associés aux UPEC
- Une forte prédominance de résistance aux antibiotiques
- Un sérotype atypique pour les UPEC c'est-à-dire principalement O11 et O77
- Une association avec le groupe phylogénétique D

D'autres techniques déjà mentionnées pour l'identification de clones ont également été employées, comme le profil sur gel d'électrophorèse à champ pulsé, pour caractériser ce groupe. Par la suite, la prédominance et les caractéristiques des CGA ont fait l'objet de plusieurs études (France *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2004; Johnson *et al.*, 2005c; Manges *et al.*, 2004; Ramchandani *et al.*, 2005). Les CGA sont un bon exemple à la fois de la clonalité d'*E. coli* mais également de la diversité de celle-ci pour causer une seule maladie puisque ce groupe possède plusieurs caractéristiques non typiquement associées aux UPEC.

1.10 Percer la diversité pathogénique d'*E. coli*

Étant donné que la différence de virulences entre une souche non-pathogène et une souche pathogène réside dans leur différence génétique, de multiples techniques ayant pour but d'identifier les facteurs supplémentaires que possède une souche pathogène ont été développées. Cette nécessité, visant une meilleure compréhension des mécanismes de pathogenèse bactérienne, est d'autant plus justifiable lorsque plusieurs groupes de souches très divergentes arrivent à causer une même maladie. Les gènes pouvant être isolés d'une souche pathogène qui ne se retrouvent pas chez une souche commensale sont potentiellement des gènes associés à la virulence (Handfield et Levesque, 1999). De plus, l'expression différentielle des facteurs de virulence peut également aider à les identifier. Par exemple, un gène peut être exprimé sous certaines conditions mais pas sous d'autres (i.e. *in vivo* vs *in vitro*). Les techniques majeures sont discutées dans le cadre de cette section.

1.10.1 L'hybridation soustractive

Cette technique permet d'isoler des fragments d'ADN génomiques présents chez une souche et absents d'une autre. Le choix des souches peut être porté entre une souche pathogène et une commensale ou encore entre deux souches pathogènes (i.e. une plus connue et une moins typique). Essentiellement, l'ADN génomique des deux souches est isolé et fragmenté, soit par digestion enzymatique ou encore par sonification. L'ADN de la souche d'intérêt est lié à des séquences terminales définies « tags » et l'ADN de la souche à éliminer est marqué à la biotine. Par la suite, l'ADN des deux souches est hybridé. L'ADN de la souche d'intérêt s'étant lié à l'ADN de la souche à éliminer est écarté à l'aide de l'interaction biotine-streptavidine. Cette opération est répétée quelques fois et la banque de fragments d'ADN ainsi obtenue correspond à des fragments uniques de la souche d'intérêt. Celle-ci peut être amplifiée par PCR en employant les tags et être clonée et séquencée. Cette technique a été employée pour de nombreux microorganismes et a permis la découverte de plusieurs facteurs de virulence (Handfield et Levesque, 1999; Morrow *et al.*, 1999; Straus et Ausubel, 1990; Winstanley, 2002).

Il existe une variation de cette technique nommée « hybridation soustractive suppressive ». Le principe d'hybridation de fragment d'ADN génomique de deux souches est le même. Par contre, celle-ci emploie deux tags liés à l'ADN de la souche d'intérêt et aucune modification à l'ADN de la souche à éliminer. Deux étapes d'hybridation mènent à différentes combinaisons de fragments d'ADN hybridés avec différentes combinaisons de tags. Par la suite deux PCR sont effectués ce qui permet une amplification préférentielle des fragments disposant des deux tags différents à leurs extrémités tout en éliminant tous les hybrides ayant eu lieu avec de l'ADN non-taggué (i.e. de la souche à éliminer). (voir Fig. 1.8) Cette amplification différentielle est basée sur le fait que les fragments doubles brins ayant un tag identique à chaque extrémité vont préférentiellement former une structure secondaire basée sur cette homologie plutôt que de lier une amorce lors de l'étape d'appariement du PCR, empêchant ainsi leur amplification (Clontech, 2001; Winstanley, 2002).

Les avantages de l'hybridation soustractive et de l'hybridation soustractive suppressive réside dans le fait qu'elles ne requièrent pas de manipulation génétique et peuvent être employées sur n'importe quel organisme duquel on peut isoler l'ADN génomique. Par contre, le fait que l'on ne sache en rien si les fragments d'ADN isolés sont exprimés *in vivo* ou même si ceux-ci codent pour des protéines fonctionnelles représente le désavantage principal (Handfield et Levesque, 1999).

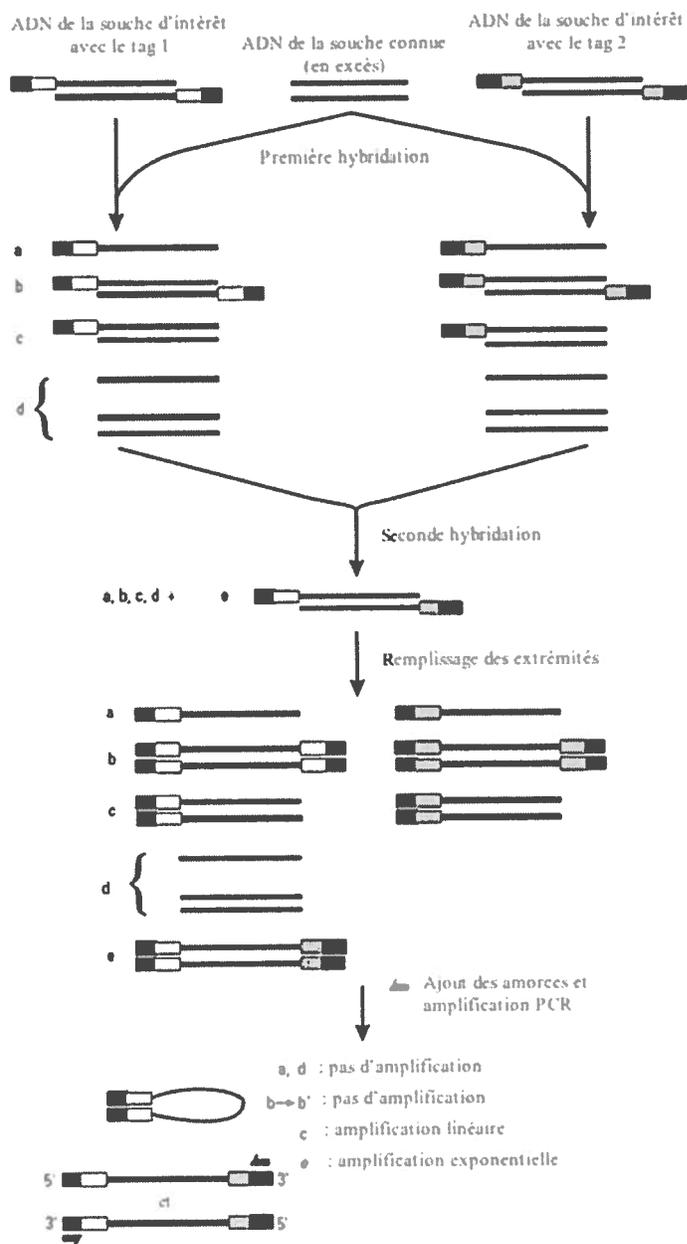


Fig. 1.8. Principe de l'hybridation soustractive suppressive. Deux sous-groupes d'ADN de la souche d'intérêt sont hybridés avec deux tags différents, ces deux groupes sont ensuite hybridés en parallèle avec de l'ADN d'une souche dont on désire retirer le contenu génétique de la banque. Ensuite on hybride les deux sous-groupes ensemble et l'on procède à l'amplification préférentielle par PCR. Il n'y a pas d'amplification des hybrides « a » et « d » puisque qu'il manque de tags, l'hybride « c » ne subira qu'une amplification linéaire et l'hybride « b » ne sera que très peu amplifié dû à la formation d'une structure secondaire à cause de la présence de longues séquences homologues parce qu'il possède deux tags identiques. Seul l'hybride « e », correspondant à de l'ADN unique de la souche d'intérêt, subira une amplification exponentielle. Adaptée de (Clontech, 2001).

1.10.2 « *In vivo* expression technology » (IVET)

IVET est basée sur le principe d'identification de promoteurs « ouverts » (permettant l'expression) *in vivo*. Dans la technique initiale, l'ADN génomique d'une souche d'intérêt est extrait et digéré. Ensuite on crée une banque de clones avec ces fragments d'ADN génomique que l'on insère devant un gène essentiel *purA* et un gène rapporteur *lacZY* qui sont dépourvus de promoteur dans un plasmide. Ce clonage est effectué chez une souche permettant la réplication du plasmide. Par la suite, on transfère ces plasmides chez la souche sauvage d'intérêt chez laquelle une auxotrophie $\Delta purA$ est présente. Cette souche ne peut croître en l'absence du gène *purA* ou la présence de purine ajoutée au milieu et ne permet pas la réplication du plasmide. On effectue une sélection pour l'intégration chromosomique du plasmide par recombinaison homologe (avec le fragment d'ADN cloné) à l'aide de la résistance antibiotique. Ensuite, on crée des sous-groupes de ces clones intégrés et on effectue des infections dans un modèle animal. Les clones possédant une recombinaison qui a placée les gènes *purA* et *lacZY* devant un promoteur exprimé *in vivo* (ou de façon constitutive) seront viables et pourront être récupérés des organes infectés. Cependant, les clones ayant été intégrés dans une région où aucun promoteur ne permet leur expression sont non-viables à cause de leur auxotrophie. Par la suite, on peut vérifier si les clones récupérés des organes (i.e. qui ont un promoteurs exprimés *in vivo*) permettent également une expression *in vitro* grâce à la présence du gène rapporteur *lacZY*. On peut ainsi concentrer nos efforts de recherche sur les promoteurs qui sont exprimés uniquement *in vivo*. L'identification de ces derniers peut permettre la reconnaissance de gènes importants durant une infection. Quelques variations de cette technique ont été développées entre autres pour les gènes et auxotrophies employées (Chiang *et al.*, 1999; Handfield et Levesque, 1999; Salyers et Whitt, 2002). IVET a permis la détection de plusieurs facteurs importants chez plusieurs pathogènes (Handfield et Levesque, 1999; Heithoff *et al.*, 1997). Le principal avantage de cette technique, est qu'elle permet l'identification des gènes qui sont exprimés *in vivo*. Par contre, elle nécessite la création d'une banque de clones d'une taille considérable en plus de faire une discrimination sans nuance qu'un gène exprimé *in vitro* n'est pas

important pour la virulence. De plus les gènes faiblement exprimés *in vivo* peuvent être manqués. (Chiang *et al.*, 1999; Handfield et Levesque, 1999; Salyers et Whitt, 2002).

1.10.3 « Signature-tagged mutagenesis » (STM)

STM est basé sur la création d'une banque de mutants aléatoires et l'identification des mutants dont la virulence est diminuée *in vivo*. On emploie une multitude de transposons possédant un tag unique. Ceux-ci sont transformés chez la souche d'intérêt et ils s'insèrent aléatoirement dans le chromosome. Il en résulte une banque de mutants avec une identification unique. Les mutants sont conservés individuellement en plaques et ensuite divisés en sous-groupes pour être employés conjointement dans un modèle animal. Suite à l'infection, on récupère l'organe d'intérêt, on effectue un PCR avec des amorces à chaque extrémités des tags (commune à tous les transposons) avec des dNTPs marqués. L'ADN issu du PCR représente tous les tags présents dans l'organe suite à l'infection. Celui-ci est ensuite employé comme sonde de criblage pour détecter les mutants qui ont « disparu » *in vivo*. Ces derniers possèdent fort probablement une insertion dans un gène important durant l'infection. La région d'ADN possédant l'intégration du transposon peut ensuite être clonée et séquencée. Comme pour IVET, le principal avantage de cette technique est qu'elle identifie des gènes qui sont exprimés *in vivo*, cependant, elle nécessite la création d'une banque de mutants de taille considérable. Le deuxième désavantage de cette technique réside dans la nécessité d'optimiser plusieurs paramètres comme la complexité du sous-groupe, la voie d'administration à l'animal, la dose administrée, le temps d'incubation... Tous ces paramètres peuvent jouer sur la quantité et la complexité de l'ADN avec les tags pouvant être isolé de l'organe visé et par conséquent, moduler le signal d'hybridation. Ceci peut donc donner lieu à de faux positifs simplement par manque de signal. (Chiang *et al.*, 1999; Handfield et Levesque, 1999; Salyers et Whitt, 2002).

1.10.4 « Selective capture of transcribed sequences » (SCOTS)

SCOTS est une technique de capture de transcripts bactériens exprimés sous une condition précise. Elle est basée sur le principe de l'hybridation d'ADNc sur l'ADN génomique d'une souche d'intérêt. Les étapes de la technique de SCOTS sont schématisées dans un exemple (celui de l'expérimentation réalisée durant ce projet de maîtrise) à la figure 1.9. La première étape est de faire croître la souche d'intérêt en interaction avec des cellules en culture ou encore dans un modèle d'infection animal. Après la période d'incubation, on extrait l'ARN total des cellules en culture ou de l'organe infecté visé. Plusieurs organes ou puits de culture cellulaire sont employés pour augmenter la diversité. Cet ARN est par la suite transcrit en ADNc avec une amorce comprenant une portion aléatoire et une portion définie (tag). Ce mélange d'ADNc comporte principalement de l'ADNc correspondant à des transcripts eucaryotes, mais également une petite portion d'ADNc correspondant à des transcripts bactériens. Parmi ces transcripts bactériens, seulement environ 4% correspondent à des ARNm alors que 82% correspondent à des ARNr (Daigle *et al.*, 2002).

La première étape de SCOTS, que l'on nomme « capture » consiste à repêcher l'ADNc correspondant aux transcripts bactériens d'ARNm. Pour se faire, on isole l'ADN génomique de la souche d'intérêt, on le fragmente et on le marque avec de la biotine. On préhybride ce dernier avec une grande quantité d'ADNr puis on effectue une hybridation avec notre mélange d'ADNc. En théorie, seuls les ADNc correspondant à des transcripts d'ARNm bactériens peuvent s'hybrider avec cet ADN génomique biotinilé. Ceci est dû au fait que l'ADNc correspondant aux transcripts eucaryotes ne trouve pas de région d'homologie et que l'ADNc correspondant à de l'ARNr bactérien ne peut se lier puisque les sites sur l'ADN génomique biotinilé sont déjà occupés. Ensuite, on ajoute des billes enrobées de streptavidine à ce mélange pour permettre une capture magnétique de l'ADNc s'étant hybridé à l'ADN génomique biotinilé. Cette capture est basée sur l'interaction biotine-streptavidine et permet l'élimination de l'ADNc non-hybridé. Une étape de PCR à l'aide des séquences définies (tags) incorporées lors de la transcription inverse est effectuée et permet une amplification uniquement de l'ADNc sélectionné par

l'hybridation. Cette première étape de capture d'ADNc bactérien est répétée trois fois et permet l'élimination de l'ADNc correspondant à des transcripts eucaryotes et d'ARNr bactériens. À ce moment, le mélange d'ADNc correspond presque entièrement à des transcripts d'ARNm bactériens. Il contient donc des transcripts correspondant à diverses fonctions du métabolisme général bactérien et non-spécifique à la virulence.

Dans un second lieu, on peut effectuer une autre répétition de trois hybridations et PCR pour enrichir notre mélange d'ADNc en ADNc correspondant à des transcripts pathospécifiques. À ce moment, l'ADN génomique biotinilé est bloqué avec de l'ADN non-désiré, c'est-à-dire préhybridé soit avec de l'ADN génomique d'une souche non-pathogène (pour isoler des gènes non-présents chez cette deuxième souche) ou encore de l'ADNc ayant subi le même traitement SCOTS mais sous des conditions *in vitro* (pour isoler des gènes exprimés uniquement *in vivo*). Ceci a pour but d'éliminer des sites potentiels d'hybridation comme dans le cas de l'ADNr lors de l'étape de capture. Suite à cette étape d'enrichissement, le mélange d'ADNc contient de l'ADNc correspondant presque uniquement à des transcripts pathospécifiques ou *in vivo* spécifiques. Ces derniers peuvent être clonés et séquencés pour identifier les gènes auxquelles ils correspondent (Daigle *et al.*, 2002).

Cette technique a tout d'abord été développée et employée chez *Mycobacterium tuberculosis* et *Salmonella* en modèle d'interaction avec des cellules en culture (Daigle *et al.*, 2002; Graham et Clark-Curtiss, 1999). Plus récemment, elle a été employée avec succès pour identifier des gènes exprimés *in vivo* dans des organes d'animaux infectés (Baltes et Gerlach, 2004; Dozois *et al.*, 2003). Cette technique comporte l'avantage de fournir des gènes exprimés *in vivo* sans nécessiter la création de banques exhaustives de clones ou de mutants. Elle est applicable à tout organismes pour lesquels on peut isoler l'ADN et qui possèdent un modèle d'infection animal ou un modèle d'interaction en culture cellulaire (Daigle *et al.*, 2002). La principale difficulté reliée à cette technique est la nature instable de l'ARNm bactérien et l'obtention d'une quantité suffisante de celui-ci.

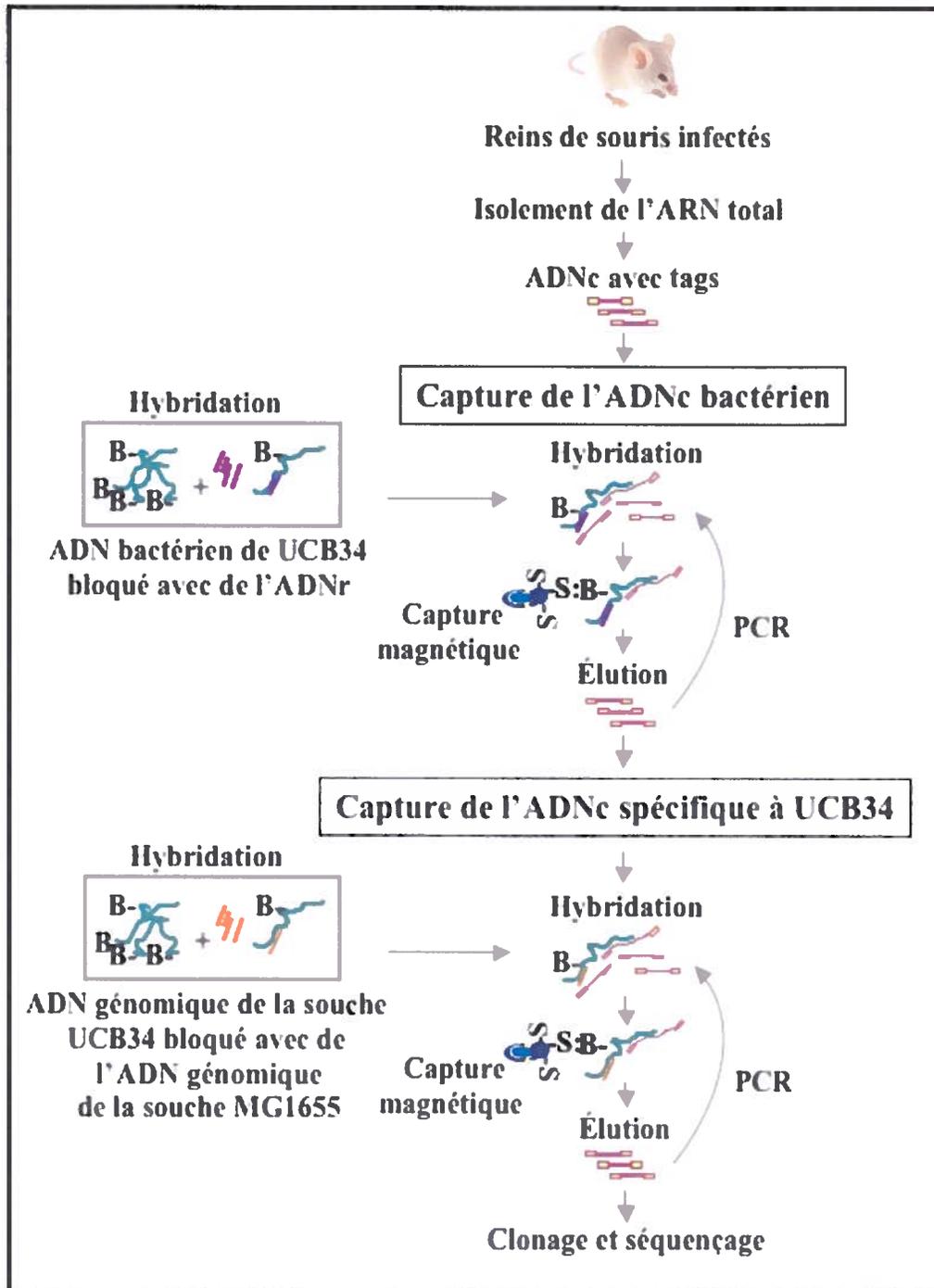


Fig. 1.9. Représentation schématique de la technique de SCOTS, l'exemple représente l'expérience effectuée lors de ce projet de maîtrise. L'étape de capture permet d'éliminer l'ADNc correspondant aux transcrits eucaryotes et l'étape de capture de l'ADNc spécifique à la souche UCB34 (ou étape d'enrichissement) permet de sélectionner l'ADNc correspondant aux transcrits pathospécifiques. UCB34 est la souche d'intérêt et MG1655 est la souche non-pathogène employée pour enrichir le mélange d'ADNc en ADNc correspondant à des transcrits pathospécifiques. B : biotine et S :streptavidine.

1.10.5 Le séquençage génomique et les biopuces

La disponibilité des séquences complètes de plusieurs génomes de microorganismes pathogènes et commensaux permet également l'identification de gènes de virulence (Fitzgerald et Musser, 2001; Frosch *et al.*, 1998; Wren, 2000). Ces génomes peuvent être analysés pour détecter la présence de gènes homologues à des facteurs de virulence connus (ex. (Parham *et al.*, 2004)) ou encore la comparaison du génome d'une souche pathogène avec celui d'une souche commensale peut révéler la présence d'un ajout pouvant coder pour un système aidant la virulence (ex. (Hayashi *et al.*, 2001; Makino *et al.*, 2003)). De plus l'accessibilité de ces séquences génomiques a permis de développer la technique des biopuces (Fitzgerald et Musser, 2001; Hinton *et al.*, 2004). Cette technologie permet d'obtenir l'information transcriptionnelle de tout un génome sous une condition donnée. Elle est basée sur le principe d'hybridation de fragments de gènes sur une plaque avec l'ADNc marqué correspondant à tous les ARNm recueillis sous une condition (Dharmadi et Gonzalez, 2004). Le niveau d'expression de chaque gène du génome peut être déterminé, permettant ainsi l'identification des gènes exprimés sous des conditions s'approchant des conditions retrouvées *in vivo* (Ball et Trevors, 2002; Conway et Schoolnik, 2003; Dharmadi et Gonzalez, 2004; Hinton *et al.*, 2004). Récemment, une étude du transcriptome d'une souche UPEC a été réalisée sous la condition d'urine *ex vivo* dans un modèle murin utilisant la souche CFT073 (Snyder *et al.*, 2004). Les études transcriptionnelles par biopuces fournissent de l'information pertinente sur l'expression des gènes métaboliques, de facteurs de virulence déjà connus ainsi que de gènes inconnus. Par contre elles sont limitées aux génomes déjà séquencés. Étant donné les coûts associés au séquençage génomique, il paraît évident que toute la diversité d'*E. coli* ne pourra être résolue par ces moyens. L'emploi des techniques ne nécessitant pas la connaissance de la séquence génomique de la souche étudiée est donc la voie à employer dans le cas de souches peu caractérisées.

1.10.6 Autres méthodes dignes de mention

Le DFI pour « Differential fluorescence induction » est une technique basée sur le même principe que IVET à l'exception que la capture de promoteur se fait en employant la protéine fluorescente GFP à la place de la complémentation d'une auxotrophie. L'analyse se fait par FACS (Fluorescence activated cell sorter) (Chiang *et al.*, 1999; Handfield et Levesque, 1999).

L'analyse protéomique par gel d'électrophorèse 2D sous deux conditions de culture différentes ou encore de deux souches différentes sous une même condition de culture peut permettre l'identification de protéines uniques. Ces protéines uniques peuvent ensuite être identifiées par spectre de masse (Handfield et Levesque, 1999; Wren, 2000).

IVIAT pour « *in vivo*-induced antigen technology » est une technique récente qui est basée sur la présence d'anticorps contre certains produits de gènes induits lors d'infection. Tout d'abord, on doit cloner une banque de fragments d'ADN correspondant au chromosome de la souche d'intérêt dans un vecteur d'expression chez *E. coli*. Ensuite, on recueille le sérum de patients ayant été victime de l'infection causée par le microorganisme d'intérêt et on l'adsorbe avec une culture *in vitro* du microorganisme en question. En théorie, il ne reste que les anticorps dirigés contre des antigènes exprimés uniquement *in vivo* (parmi ceux qui sont dirigés vers l'organisme d'intérêt). On effectue donc une sélection des clones qui réagissent avec ce sérum adsorbé. Ceux-ci expriment donc un antigène reconnu par les anticorps présents dans le sérum et sont susceptibles d'exprimer un gène important *in vivo*. Cette technique possède l'énorme avantage de ne pas employer un modèle animal, mais bien la maladie et l'hôte naturel. Par contre, elle est limitée aux antigènes qui peuvent être reconnus par une réponse humorale (Handfield *et al.*, 2000; Rollins *et al.*, 2005). Cette technique a récemment été employée avec succès pour la souche O157:H7 de *E. coli* ainsi que chez *Vibrio cholerae* (Hang *et al.*, 2003; John *et al.*, 2005).

1.11 De l'identification d'un gène au facteur de virulence établi

Suite à l'identification d'un gène ou d'un facteur de virulence possible par les diverses techniques mentionnées précédemment, les étapes en vue de sa caractérisation sont les suivantes : prouver que ce gène ou système est fonctionnel, qu'il confère un phénotype et vérifier s'il contribue à causer la maladie (Falkow, 2004). La consultation des banques de données sur les protéines déjà connues et l'identification de protéines homologues permet souvent de donner de bonnes pistes sur la fonction possible du facteur à l'étude. Pour trouver un phénotype, la principale stratégie consiste à cloner le ou les gènes en question et à tenter de montrer un phénotype *in vitro* (Salyers et Whitt, 2002). Pour vérifier l'importance *in vivo*, le meilleur moyen reste encore la création d'un mutant et l'emploi de celui-ci dans un modèle d'infection animale (Falkow, 2004; Johnson, 1991). Depuis quelques années, une des techniques la plus employée pour la génération de mutants chez *E. coli* est celle faisant appel au système de recombinaison Red du phage λ (Murphy et Campellone, 2003).

1.11.1 Création de mutants par la technique du système recombinaison λ Red

La technique a été développée par Datsenko et Wanner en 2000 (Datsenko et Wanner, 2000). Elle est basée sur trois principes : l'inactivation temporaire du système d'exonucléase chez la souche réceptrice pour permettre la transformation de fragment d'ADN linéaire, l'expression temporaire d'une recombinaison phagique pour faire la promotion de la recombinaison homologe ainsi que l'emploi d'une excisase de levure pour enlever la cassette de résistance à un antibiotique si désiré. Elle emploie le système Red du bactériophage lambda qui est composé de trois gènes codant pour les protéines Gam, Bet et Exo. Gam agit en inhibant l'action de l'exonucléase V RecBCD de l'hôte qui, en temps normal, dégrade l'ADN linéaire étrangère tandis que Bet et Exo font la promotion de la recombinaison (Murphy, 1998; Yu *et al.* 2000). Le système λ Red a été cloné dans un plasmide thermosensible sous le contrôle d'un promoteur inductible. La première étape consiste à transformer la souche chez laquelle une mutation est désirée avec ce plasmide. Ensuite, on crée un allèle tronqué du gène que l'on veut déléter en

employant une cassette de résistance à un antibiotique qui est bordée par de petites séquences nommées FRT. La méthode la plus simple consiste à créer des amorces qui possèdent une région d'une trentaine de paires de bases d'homologie de chaque côté du gène que l'on veut muter, pour amplifier la cassette de résistance (voir Fig 1.10). Après avoir effectué un PCR, on se retrouve avec un cassette de résistance bordée à chaque extrémités par les petites séquences FRT et par les régions d'homologies. Alternativement, on peut créer un allèle muté dans une copie clonée du gène en employant une des cassette avec les sites FRT et ensuite l'amplifier par PCR. Cette deuxième alternative permet d'avoir une plus grande région d'homologie de chaque côté de l'allèle muté. Finalement, on prépare des cellules compétentes sous des conditions où le système Red est exprimé et on transforme ces bactéries avec l'ADN linéaire correspondant à l'allèle muté amplifié par PCR. Le système de recombinaison va insérer l'allèle muté à la place de l'allèle sauvage du gène d'intérêt et on élimine le plasmide par une croissance des bactéries à 37°C puisque celui-ci est thermosensible (Datsenko et Wanner, 2000). On se retrouve donc avec une souche possédant un allèle muté et qui n'exprime plus le système λ Red.

On peut conserver le mutant tel quel ou encore enlever la cassette de résistance par l'action de la protéine FLP qui est une recombinaison de levure. Celle-ci a également été clonée dans un plasmide thermosensible qui peut être transformé chez la nouvelle souche mutante. Cette enzyme va faire la promotion de la recombinaison entre deux sites FRT et éliminer le fragment d'ADN se trouvant entre ces deux sites (Cherepanov et Wackernagel, 1995). Comme la cassette de résistance est bordée par deux de ces sites FRT, on peut éliminer la cassette et ensuite se débarrasser du plasmide par croissance à 37°C (Datsenko et Wanner, 2000). On se retrouve donc avec une souche qui a perdu le gène voulu et qui ne possède plus de cassette de résistance à l'antibiotique. Il ne reste qu'une petite cicatrice (voir Fig. 1.10). La technique est très efficace chez les souches de laboratoire K-12. Par contre, chez les souches sauvages, le taux de réussite est plus faible. Quelques améliorations ont été apportées à la technique pour l'utilisation chez les souches sauvages de *E. coli* (Murphy et Campellone, 2003).

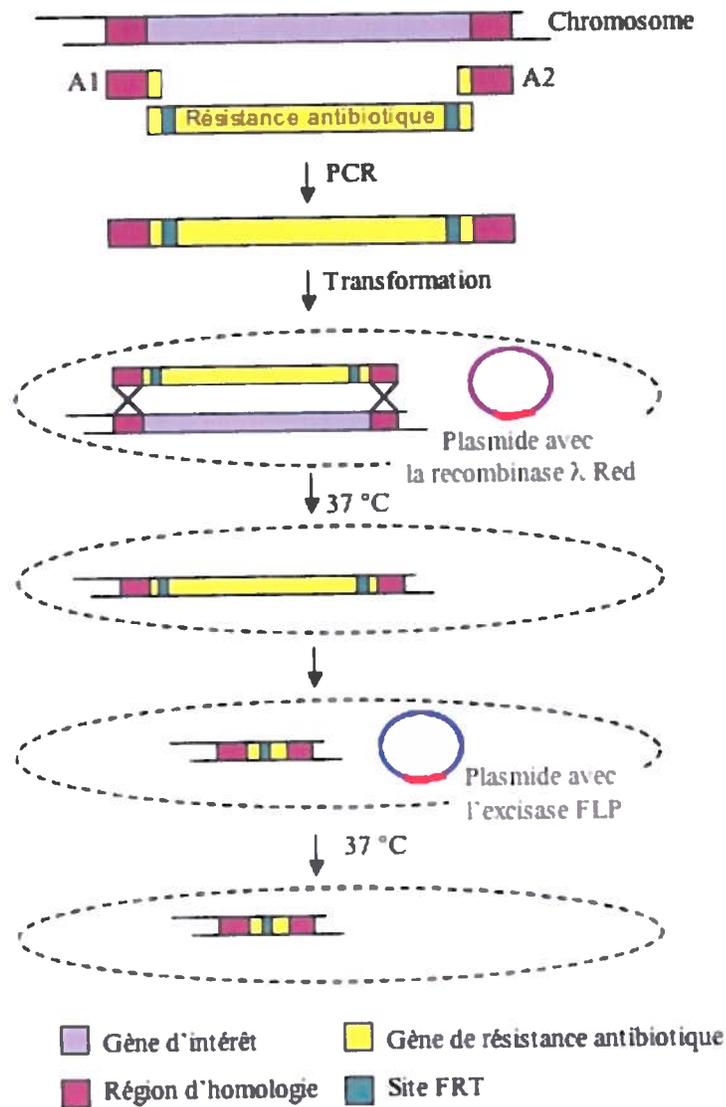


Fig. 1.10. La création d'un mutant pour un gène d'intérêt par la technique de Datsenko et Wanner. Un allèle tronqué par une cassette de résistance à un antibiotique est créée soit par PCR soit sur une copie cloné du gène. Celui-ci est incorporé dans le génome de la souche d'intérêt par le système de recombinaison Red du phage λ . La cassette de résistance à l'antibiotique peut ensuite être éliminée par l'excisase de levure FLP. A1 et A2 : amorces 1 et 2.

Chapitre II

Expérimentations préalables et supplémentaires

2.1 Identification de gènes pathospécifiques

Afin de rencontrer l'objectif d'identification de facteurs de virulence pathospécifiques à la souche UCB34, deux techniques ont été employées soit la technique de SCOTS et l'hybridation soustractive suppressive. Elles ont permis d'identifier un certain nombre de gènes ou facteurs spécifiques.

2.1.1 Résultats obtenus à l'aide de SCOTS

Les étapes employées avec la technique de SCOTS sont présentées dans l'article et sont schématisées à la figure 1.9 du précédent chapitre. Suite à la première étape de capture, une étape de vérification a été effectuée. Elle consistait à une hybridation de type Southern où l'ADN génomique de la souche UCB34 était digéré, migré et transféré sur la membrane et la sonde était la banque de fragments d'ADNc SCOTS après la première étape de capture. Une bonne diversité dans la banque d'ADNc SCOTS aurait dû montrer une multitude de bandes positives sur la traînée d'ADN génomique. Ce ne fut pas le cas, on ne pouvait observer qu'un nombre limité de bandes. Malgré cela, nous avons poursuivi avec la seconde étape de SCOTS qui visait à enrichir la banque en ADNc correspondant à des transcrits spécifiques à UCB34. Suite à cette étape, une autre vérification d'hybridation de type Southern a été effectuée. Le résultat était encore une fois un peu décevant en ce qui concerne la diversité attendue. Malgré cela, la banque d'ADNc a été clonée.

Quelques milliers de clones ont été obtenus, leur taille se situait entre 100 et 500pb en moyenne. 210 clones ont été criblés par hybridation de type Southern avec trois sondes : une sonde représentant tout le génome de la souche K-12 MG1655, une sonde pour l'ADNr ainsi qu'une dernière représentant tout le génome de la souche UCB34. Environ 40 à 50% des clones étaient des clones de fragments SCOTS correspondant à des transcrits d'ADNr. Seul un très faible nombre de clones semblait contenir des fragments correspondant à des transcrits de la souche K-12 autre que de l'ADNr. Une très grande proportion de clones ne montraient aucun signal d'hybridation avec les trois sondes.

Finalement un faible nombre de clones semblaient être uniques à la sonde correspondante à l'ADN génomique de la souche UCB34. Parmi ces 210 clones, 12 ont été séquencés. La grande majorité correspondaient à des transcripts issus de la souris, un correspondait à de l'ADNr bactérien et finalement le gène pathospécifique *iha* a été isolé.

Iha n'est pas un nouveau facteur de virulence. Au moment où nous l'avons isolé par SCOTS, un article relatait sa découverte et quelques articles sur sa prévalence étaient parus. Il avait été décrit comme une adhésine chez la souche EHEC O157 :H7 (Tarr *et al.*, 2000) et aucun mutant ni vérification de l'importance dans la virulence n'avait été étudié. Nous avons donc décidé de poursuivre la caractérisation de ce système dans notre modèle de souche CGA UPEC. Au cours de nos travaux, un second article sur *Iha* est paru (Johnson *et al.*, 2005a). Celui-ci portant sur la virulence dans un modèle de souche UPEC classique, CFT073. Néanmoins, nos travaux apportent un nouveau regard sur ce facteur de virulence car ils empruntent des avenues qui n'avaient pas été explorées jusqu'à présent. C'est entre autre la première fois sa fonction de récepteur de sidérophore est démontrée. La caractérisation que nous avons faite d'*Iha* fait l'objet d'un article qui est présenté au chapitre 3.

En plus des travaux présentés dans l'article, deux tentatives afin de confirmer le rôle de *Iha* pour la virulence ont été effectuées. Deux souches complémentées du mutant QT686 (UCB34 Δiha) ont été créées et employées en compétition avec la souche sauvage dans le modèle d'IU murin. Le modèle d'infection urinaire murin employé est expliqué brièvement dans l'article (voir section 3.2.3.2) et ces expérimentations sont effectuées dans le laboratoire de notre collaborateur le Dr. J.R. Johnson. Pour la première expérience, le plasmide pIJ84 (*iha* avec son propre promoteur dans pACYC184) a été introduit chez la souche mutante QT686 pour créer la souche complémentée QT808. Cette dernière a été mise en compétition avec la souche sauvage chez qui le plasmide pACYC184 sans insert avait été introduit (QT806). Le résultat montra que la souche sauvage avait toujours un avantage sur la souche mutante malgré la complémentation. Dans une deuxième expérience, une souche complémentée par une insertion simple du gène *iha* dans le chromosome de la souche mutée a été créée. Pour créer cette deuxième

souche complémentée, le gène *iha* de la souche UCB34 (avec son propre promoteur) issu du plasmide pIJ106 par digestion BamHI-ClaI a été cloné dans le vecteur suicide pST76-C, ce qui donna le plasmide pIJ113. Le vecteur employé est un vecteur suicide thermosensible qui s'intègre dans le génome par homologie à l'endroit exact de l'insert qu'il contient (Posfai *et al.*, 1997). Le plasmide pIJ113 a été intégré au génome de la souche QT686 pour créer la souche complémentée QT896. La stabilité de cette insertion a été vérifiée par trois passages en LB à 37°C sans pression antibiotique suivis par une vérification de la rétention de la résistance par décompte bactérien. La souche QT896 contient donc une copie intégrée au chromosome du gène *iha* et elle a été employée en compétition avec la souche sauvage UCB34 dans le modèle d'IU murin. Les résultats sont présentés à la figure 2.2 et montrent clairement que la souche complémentée n'est pas aussi virulente que la souche sauvage.

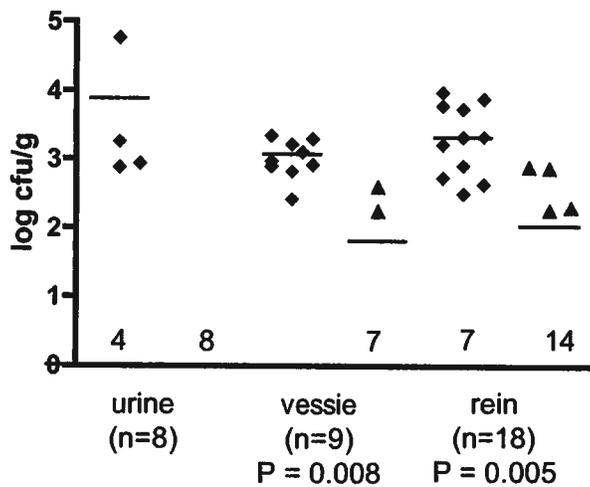


Fig. 2.2 Nombre de bactéries (log cfu/g) présent dans l'urine, la vessie, et les reins de souris coinfectés avec la souche sauvage UCB34 (◆) et la souche complémentée QT896(▲). Les points représentent les comptes bactériens ajustés (normalisés avec le rapport souche sauvage vs mutant de l'inoculum) des tissus et de l'urine isolés des différentes souris. Les lignes horizontales représentent la moyenne. Les chiffres près de la limite du log 0 indiquent des échantillons où aucune bactérie n'a été isolée. L'urine n'a été disponible que pour 8 des 9 souris. L'analyse statistique a été effectuée en employant le test de Wilcoxon.

2.1.2 Résultats obtenus à l'aide de l'hybridation soustractive

L'hybridation soustractive suppressive a été effectuée en employant le kit « CLONTECH PCR-Select™ bacterial genome subtraction kit » et en suivant les instructions fournies par le manufacturier (Clontech, 2001). Les étapes sont schématisées à la figure 1.8 du précédent chapitre. L'ADN de la souche UCB34 a été employé comme souche d'intérêt et celui de la souche UPEC typique CFT073 a été employé pour éliminer de la banque l'ADN non spécifique à la souche UCB34. La banque de fragments d'ADN unique à UCB34 a été clonée et quelques centaines de clones ont été obtenus. 47 de ceux-ci ont été séquencés et les résultats sont présentés au tableau 2.1. Quelques clones étaient des répétitions du même fragment d'ADN, mais la grande majorité était unique et ce, même s'ils représentaient un même gène (i.e. portion différente de ce gène). Seuls quatre clones représentaient des gènes se trouvant chez la souche CFT073.

Un clone correspondant à un homologue de système de sécrétion de type trois a été identifié. Il semblait très intéressant et fit l'objet d'études plus approfondies. La prochaine section présente les travaux effectués sur ce système un peu à la manière d'une « Note » c'est-à-dire matériels et méthodes combinées avec les résultats.

Tableau 2.1. Les clones obtenus par hybridation soustractive entre la souche UCB34 et CFT073. Ils peuvent être classés en trois grands groupes en fonction de leurs homologues avec des protéines connues ou hypothétiques chez différentes bactéries¹.

Fonctions associées	Nombre de clones	Protéines homologues	Bactéries	Homologies (% similarité)	
Fonction plasmidique	12	Protéine de mobilisation de plasmide	<i>E. coli</i> ² <i>Salmonella</i>	98 93	
	2	Protéine de conjugaison	<i>E. coli</i> ² <i>Shigella</i>	100 97	
	1	Protéine de partition de plasmide	<i>Shigella</i> <i>E. coli</i> ²	100 54	
	1	Recombinase de plasmide ou intégrase	<i>Yersinia</i> <i>E. coli</i> ² <i>Citrobacter</i>	69 67 67	
	Métabolisme général	3	Topoisomérase	<i>Citrobacter</i> <i>E. coli</i> ²	98 95
		1	Protéine de division cellulaire	<i>E. coli</i> ³	100
		1	Aconitate hydratase	<i>E. coli</i> ³ <i>Salmonella</i>	97 74
1		Sulfite réductase	<i>E. coli</i> ³ <i>Shigella</i> <i>Salmonella</i>	100 100 100	
1		ADP-ribosylglycohydrolase hypothétique	<i>E. coli</i> ³ <i>Shigella</i> <i>Salmonella</i>	99 99 91	
Hypothétique et facteur de virulence ⁴		1	Transporteur ABC hypothétique	<i>Citrobacter</i>	98
		5	« ABC-type multidrug resistance » hypothétique	<i>Pyrococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Streptococcus</i>	50 49 48
		1	Lipopolysaccharide 1,2-N-acetylglucosaminetransferase	<i>E. coli</i> ² <i>Shigella</i>	99 97
	5	Protéine hypothétique	<i>Legionella</i>	47	
	5	Protéines hypothétiques variées	<i>Citrobacter</i>	Variées	
	1	Protéine de prophage	<i>E. coli</i> ²	98	
	1	Système de sécrétion type III	<i>E. coli</i> ²	98	
	4	Aucune	-	-	

¹ : Données obtenues en employant les services « Blastn, tBlastx et ORF finder » de NCBI (NCBI, 2005) et Coliblast de Colibase (Chaudhuri *et al.*, 2004)

² : Absent de la souche CFT073

³ : Présent chez la souche CFT073

⁴ : Clones pathospécifiques à la souche UCB34 par rapport à la souche CFT073

2.2 Le système de sécrétion de type trois (SSTT) identifié

2.2.1 Présentation du système

Le fragment d'hybridation soustractive correspondant à une petite portion d'un homologue de SSTT (voir Fig. 2.1) fait partie d'un système déjà identifié chez quelques souches d'*E. coli* (Makino *et al.*, 2003; Miyazaki *et al.*, 2002a). Celui-ci fait environ 30kb et a été nommé ETT2 pour « *E. coli* type three secretion system 2 ». Cependant, aucune preuve de sa fonctionnalité ou de son rôle dans la virulence n'a encore été apportée. Au contraire, il semblerait non-fonctionnel chez la plupart des souches d'*E. coli* (Ren *et al.*, 2004). Nous avons décidé de tenter de caractériser ce système de virulence chez les souches CGA.

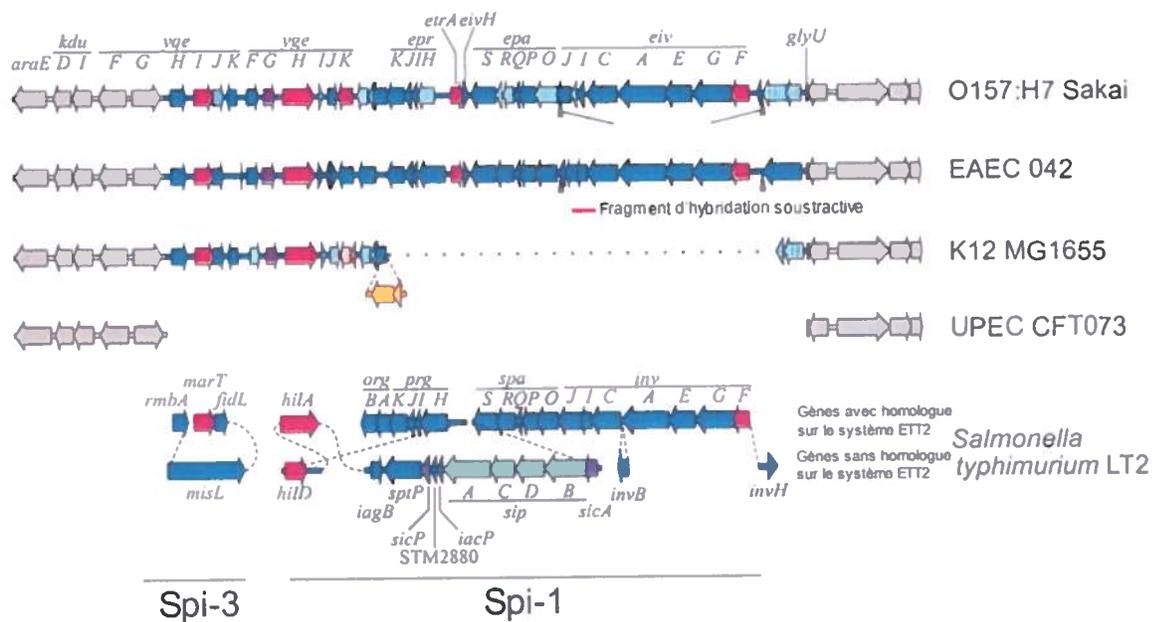


Fig. 2.1. Le SSTT hypothétique ETT2 présent chez deux souches d'*E. coli* et absent chez deux autres avec les homologues du SSTT du SPI1 de *Salmonella typhimurium*. Un fragment de 684pb de la souche UCB34 correspondant à ce système a été identifié par hybridation soustractive. Adaptée de (Ren *et al.*, 2004).

2.2.2 Travaux effectués sur le système ETT2

2.2.2.1 Criblage

L'intégrité du système en terme de présence, a été vérifiée chez 30 souches membres du groupe CGA. La stratégie employée est la même que celle décrit par Ren *et al.* et consiste en un criblage PCR du système par fragment d'environ 5kb à la fois (Ren *et al.*, 2004). Les mêmes amorces ont été employées. Cette section a été effectuée avec l'aide de Kathrine Poirier, stagiaire au laboratoire. Elle révéla que le système est présent dans sa totalité en terme de taille chez les 30 souches CGA criblées.

2.2.2.2 Mutant

Un mutant de ce système a été créé chez la souche UCB34. La stratégie employée a été de construire un allèle muté dans un clone partiel du système pour ensuite le transférer chez la souche sauvage par recombinaison homologue à l'aide de la technique du système de recombinaison λ Red (Datsenko et Wanner, 2000). Premièrement, un fragment de 4814pb a été amplifié à l'aide des amorces CMD254 : 5'-CCGTTAGTTCCCCGTACGAAA-3' et CMD255 : 5'-GGATTATTGACTCCTGGTGCAT-3' et a ensuite été cloné dans le vecteur PCR2.1-TOPO créant ainsi le plasmide pIJ86. Pour faire ce clone, l'ADN de la souche O157 :H7 a été employé, la région est assez conservée entre les souches pour permettre une recombinaison homologue. De plus, l'emploi d'une souche dont la séquence est connue, permet de s'assurer que les sites d'enzymes de restriction voulus sont présents. Par la suite, une cassette de résistance au chloramphénicol a été amplifiée par PCR avec des amorces contenant les sites AccI et AleI (indiqué par un plus petit caractère); CMD256 : 5'-CTTGGTATACTGTGTAGGCTGCAGCTGCTTC-3' et CDM269 : 5'-AATTCACCATGGTGCATATGAATATCCTCCTTAGTTCC-3' à partir du plasmide pKD3 (Datsenko et Wanner, 2000). Dans un deuxième temps, le plasmide pIJ86 ainsi que le fragment PCR de la cassette de résistance ont été digérés à l'aide des enzymes AccI et AleI. Le résultat fut une délétion de 3681pb dans l'insert de pIJ86 et la création

d'extrémités cohésives sur le produit de PCR. Ces deux fragments furent ligués ensemble pour créer le plasmide pIJ87. Ce dernier contient donc la cassette de résistance au chloramphénicol insérée entre deux sections d'homologie d'environ 500pb d'une portion du système ETT2. Cet allèle muté a été amplifié par PCR en employant les amorces CMD255 et CMD256 pour ensuite être intégré chez la souche sauvage à l'aide de la technique du système de recombinaison λ Red, créant ainsi la souche mutante QT791. Trois gènes du système, correspondant à *eivAEG*, ont été éliminés par cette mutation (voir Fig. 2.1).

2.2.2.3 Phénotype d'invasion cellulaire

Étant donné que le SSTT homologue du SPI1 de *Salmonella* permet l'invasion cellulaire (Lostroh et Lee, 2001) et que cette invasion semble une étape importante de l'infection causée par les UPEC (Mulvey *et al.*, 2000), nous avons décidé d'investiguer si le système ETT2 des CGA pouvait conférer ce phénotype. Des tests d'invasion cellulaire de cellules épithéliales humaines en culture ont donc été effectués. Ce test est basé sur le principe qu'une bactérie ayant envahi une cellule eucaryote est protégée contre l'ajout d'antibiotique dans le milieu. Ce test comprend donc une période d'interaction entre les cellules en cultures et les bactéries, suivi de l'ajout de gentamicine dans le milieu. Les bactéries se trouvant dans le milieu sont tuées alors que celles ayant réussi à envahir les cellules ne sont pas en contact avec l'antibiotique et survivent. Les tests ont été effectués essentiellement tel que précédemment décrit (Elsinghorst, 1994; Martinez *et al.*, 2000) ainsi que sous le même principe que les tests d'adhésion décrit dans l'article (voir section 3.2.3.6). Rapidement, les cellules en plaque de 24 puits étaient lavées une fois, les bactéries étaient ajoutées (trois puits par souches bactériennes), l'interaction était initiée par centrifugation et la plaque était incubée 2h à 37°C avec 5% CO₂. Par la suite les cellules étaient lavées trois fois et du milieu frais contenant 100µg/ml de gentamicine était ajouté. La plaque était alors incubée 2h à 37°C avec 5% CO₂. Finalement, les cellules étaient lavées deux fois et lysées à l'aide d'une solution de PBS-sodium deoxycholate 1%. Des dilutions et des comptes bactériens de ces puits étaient effectués et le pourcentage de bactéries par rapport à ce qui avait été inoculé étaient calculés (nombre

de bactéries se trouvant à l'intérieur des cellules par rapport au nombre inoculé initialement). Ces données, résultant d'expériences effectuées en triplicata, représentaient donc le taux d'invasion de la souche en contact avec une lignée cellulaire donnée.

Une première série de tests a été effectuée avec quatre souches sauvages CGA, la souche K-12 MG1655 comme contrôle négatif et la souche SL1344 de *Salmonella typhimurium* comme contrôle positif. Deux types cellulaires ont été employés dans cette première série c'est-à-dire les cellules Hela, qui sont des cellules épithéliales humaines issues d'un cancer du col de l'utérus ainsi que les cellules 293, qui sont des cellules épithéliales humaines originaires du rein ayant été rendues immortelles à l'aide d'un adénovirus (ATCC, 2005). Les résultats de cette première série de tests ont montré que les souches CGA testées ne semblaient pas posséder un pouvoir d'invasion plus important que celui du contrôle négatif c'est-à-dire la souche MG1655. Par contre, la souche de *S. typhimurium* était capable d'envahir les cellules de façon significative par rapport au contrôle négatif. L'ajout de 2,5% de mannose dans le milieu de culture cellulaire pour inhiber toute invasion pouvant être médié par FimH n'a pas permis de faire ressortir une différence entre ces souches sauvages et le contrôle négatif. Une deuxième série de tests a été effectuée cette fois en employant la souche sauvage UCB34 et son mutant isogénique *eivAEG::cat* QT791. Les cellules employées ont été les T24, qui sont des cellules épithéliales humaines cancéreuses issues de la vessie (ATCC, 2005) et les cellules 293. Encore une fois, aucune différence en ce qui a trait au pouvoir d'invasion n'a pu être observée entre les deux souches. Aucun phénotype d'invasion cellulaire associé à la présence du système ETT2 chez les CGA n'a donc pu être établi.

2.2.2.4 Infection chez la souris

En poursuivant l'objectif d'établir si le système ETT2 est fonctionnel et s'il est important lors de l'infection chez les souches CGA, une expérience d'infection urinaire chez la souris a été effectuée. Le système urinaire de dix souris a été coinfesté avec un inoculum de la souche sauvage UCB34 et du mutant QT791. Les souris ont été euthanasiées 48h après inoculation et le compte bactérien des organes visés a été effectué.

Les résultats sont présentés à la figure 2.2. Sur les dix souris inoculées, seules six ont été infectées et parmi ces six souris, le taux d'infection a été très bas. Les résultats ne permettent donc pas d'établir de conclusion claire sur une différence ou un statu quo en ce qui a trait à la virulence du mutant par rapport à la souche sauvage.

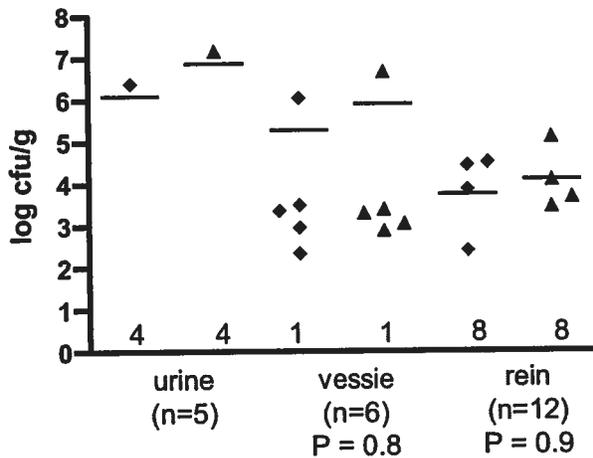


Fig. 2.3 Nombre de bactéries (log cfu/g) présent dans l'urine, la vessie, et les reins de souris coinfecteds avec la souche sauvage UCB34 (◆) et son mutant isogénique $\Delta ivAEG::cat$ QT791(▲). Les points représentent les comptes bactériens ajustés (normalisés avec le rapport souche sauvage vs mutant de l'inoculum) des tissus et de l'urine isolés des différentes souris. Les lignes horizontales représentent la moyenne. Les chiffres près de la limite du log 0 indiquent des échantillons où aucune bactérie n'a été isolée. L'urine n'a été disponible que pour 5 des 6 souris. L'analyse statistique a été effectuée en employant le test de Wilcoxon.

Chapitre III

Article scientifique

3.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été réalisés par Simon Léveillé sous la supervision du Dr. Charles M. Dozois. Les infections urinaires chez la souris ont été effectuées dans le laboratoire du Dr. James R. Johnson par Connie Clabots. La première série d'infections, dont le but était de recueillir les organes infectés, a été effectuée conjointement dans le cadre d'un stage au laboratoire du Dr. Johnson. L'extraction des colicines ainsi que le clone *fepA* pIJ68 ont été réalisés par Mélissa Caza. La rédaction de l'article a été réalisée par Simon Léveillé et révisée par tous les co-auteurs.

3.2 Article

Iha from an *Escherichia coli* UTI Outbreak Clonal Group A Strain is Expressed *In Vivo* in the Mouse Urinary Tract and Functions as a Siderophore Receptor and Adhesin

Running title: *E. coli* Iha functions as a siderophore receptor and adhesin

Simon Léveillé¹, James R. Johnson², Connie Clabots², Mélissa Caza¹ and Charles M. Dozois^{1*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, CANADA

²Medical Service, VA Medical Center, and Department of Medicine, University of Minnesota, Minneapolis, MN, U.S.A.

* Corresponding Author:

Charles M. Dozois

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, CANADA, H7V 1B7

Phone: 450-687-5010 ext. 4221 Fax: 450-686-5501

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

3.2.1 ABSTRACT

Virulence factors of pathogenic *E. coli* belonging to a recently emerged and disseminated clonal group associated with urinary tract infection (UTI), termed clonal group A (CGA), have not been experimentally investigated. We used a mouse model of ascending UTI with CGA member strain UCB34 in order to identify genes of CGA that contribute to UTI. *iha* was identified to be expressed by strain UCB34 in the mouse kidney using selective capture of transcribed sequences (SCOTS). We further characterized this virulence factor from this CGA strain. *iha* from strain UCB34 demonstrated an adhesin phenotype with human kidney and bladder epithelial cells when cloned in a poorly adherent *E. coli* K-12 strain, and a siderophore receptor phenotype when cloned in a siderophore receptor-negative *E. coli* K-12 strain. *iha* expression was regulated by the ferric uptake regulator Fur and by iron availability, as shown by real-time RT-PCR. In a competitive infection experiment using the mouse UTI model, wild-type strain UCB34 significantly outcompeted an isogenic *iha* null mutant. These data suggest that Iha may be a dual-function virulence factor in *E. coli* CGA, contributing to both adherence and siderophore uptake.

3.2.2 INTRODUCTION

Urinary tract infections (UTIs) are one of the most frequent infections in industrialized countries, and *Escherichia coli* is the major causal agent (26, 58). Many virulence factors associated with extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC), the distinctive strains that cause most UTIs, are important for establishing infection. These include adhesins, toxins, iron acquisition systems and capsular antigens (11, 23, 25). Extraintestinal infections, including UTIs, are caused predominantly by *E. coli* isolates belonging to phylogenetic group B2 (60-70%), whereas the remaining cases are caused mostly by strains belonging to phylogenetic group D (8, 40, 61). Most research into the pathogenic mechanisms of ExPEC has focused on archetype strains such as CFT073, J96, CP9, and 536, which all belong to *E. coli* phylogenetic group B2. Much less attention has been given to the virulence mechanisms of group D ExPEC strains, which represent a non-negligible cause of UTI.

Recently, a multi-drug-resistant clonal group, termed clonal group A (CGA), was identified as a cause of UTI outbreaks in California, Michigan, and Minnesota (45). It is now known that this clonal group is widespread and quite prevalent throughout the United States, and is also widely prevalent, although to a lesser extent, in many other countries (38, 39, 45). This newly emerged clonal group was responsible for up to 50% of the trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) resistant isolates identified in some areas (27, 38, 39, 45). The prevalence of resistance to TMP-SMX, which is a commonly used first line antibiotic therapy for UTIs (58), is increasing (32), emphasizing the importance of elucidating the virulence mechanisms of CGA. CGA strains derive from *E. coli* phylogenetic group D, demonstrate a fairly conserved virulence gene profile, and lack many of the virulence traits associated with other ExPEC isolates. Specifically, CGA strains commonly contain the F16 *papA* and *papG* II alleles encoding a major subunit and adhesin of P fimbriae respectively, *iutA* encoding the aerobactin siderophore receptor, *kpsMTII* encoding group II capsular antigen and *traT* encoding a plasmid associated exclusion protein, whereas they typically lack *sfa/foc* (S and F1C fimbriae), *afa/dra* (Dr-family adhesins), *hly* (hemolysin), *cnf* (cytotoxic necrotizing factor), *iroN* (siderophore

receptor), *iss* (serum resistance-associated), and *malX* (pathogenicity island marker). (38, 45) Despite lacking many of the common ExPEC-associated virulence factors, CGA strains are nevertheless able to cause UTIs in healthy women.

In order to investigate potential genes that may contribute to the capacity of CGA strains to cause UTIs, we used CGA strain UCB34 in a mouse model of ascending UTI for the identification of genes that are expressed *in vivo*. We used the cDNA capture method SCOTS (Selective Capture Of Transcribed Sequences) to recover bacterial transcripts from infected tissues. This strategy resulted in the capture of *iha* transcripts during infection in the mouse kidney.

Iha was first described as an adhesin in an enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7 strain, and was named “IrgA Homologue Adhesin” based on its homology to the IrgA siderophore receptor of *Vibrio cholerae* (48, 56). More recently, Iha was determined to be a urovirulence factor for ExPEC strain CFT073, and its double *pap* mutant UPEC76, in a mouse UTI model (37). Despite its high homology to siderophore receptors, Iha has thus far only been characterized as an adhesin. The prevalence of *iha* has been reported in a number of studies; overall, 37%-55% of UTI isolates contained *iha* or closely related sequences (5, 37, 41, 42). Certain studies have reported an epidemiological association of *iha* with *E. coli* causing UTI and other extra-intestinal diseases compared to commensal fecal *E. coli* isolates (37, 41, 42), whereas other reports did not establish an association of *iha* with ExPEC strains (5, 29). However, among CGA isolates from UTIs *iha* was present in 92% to 100% of the isolates tested (38, 39).

In this study, we characterized Iha from CGA strain UCB34. Specifically, we assessed the expression of *iha* both *in vivo* in the murine kidney during UTI and *in vitro* under different growth conditions. We also investigated the potential role of Iha as a siderophore receptor, and as an adhesin, in comparison with other siderophore receptors. Finally, we determined the importance of Iha as a urovirulence factor for strain UCB34 by performing competitive co-infection experiments with the wild-type strain and an isogenic *iha*-knockout mutant in the mouse urinary tract.

3.2.3 MATERIALS AND METHODS

3.2.3.1 Bacterial and cell culture. Bacterial strains and plasmids used are presented in Table 3.1. UCB34 is an O17/77 CGA strain isolated from a 19 year-old female with cystitis at University of California, Berkley (45). Bacteria were routinely grown in Luria-Bertani (LB) broth, Tryptic soy agar (TSA) or Nutrient broth (NB) (Gibco). T24 bladder (ATCC number: HTB-4) and 293 kidney (ATCC number: CRL-1573) epithelial cells were grown according to the ATCC recommendations.

3.2.3.2 Selective capture of transcribed sequences (SCOTS). Five female CBA/J mice (5-6 weeks old) were inoculated via a urethral catheter under non-refluxing conditions as previously described (35, 36) with a bacterial suspension of UCB34 (approx 3×10^8 CFU/ g of mouse weight). After 24 h, infected tissues were harvested aseptically. Total RNA from the kidneys of the five infected mice was extracted using TRIzol reagent (Invitrogen). RNA samples were treated with the DNA-free kit (Ambion) to remove genomic DNA contamination. Five 1 μ g samples of each RNA were converted into cDNA by random priming with Superscript II reverse transcriptase (Invitrogen) followed by Klenow treatment (NEB). Primers with a defined sequence at the 5' end and random nonamers at the 3' end (CMD115: 5'-GTGGTACCGCTCTCCGTCCGANNNNNNNNN-3') were used for first- and second-strand cDNA synthesis. Samples were then pooled and cDNA from each kidney was then amplified for 25 cycles by PCR using the defined primer. SCOTS was performed as previously described (16, 19). The initial capture round was performed with the five cDNA samples (corresponding to each kidney) in parallel. After the first round, the five cDNA samples were combined and two more rounds of capture were done. This procedure resulted in selection for cDNA corresponding to bacterial transcripts. In the second step of SCOTS, UCB34-specific transcripts (absent from *E. coli* K-12) were selectively enriched by performing three more rounds of capture while blocking for non-pathogenic transcripts using a 100-fold excess of *E. coli* MG1655 K-12 genomic DNA. Selected cDNA fragments were then cloned with a TA cloning kit (Invitrogen) and were sequenced.

3.2.3.3 Cloning the *iha* and *fepA* genes. The *iha* gene from UCB34 was PCR amplified using Elongase (Invitrogen) with the following primers: CMD204: 5'-GGTGGAAATCCGCTTCTACAG-3' and CMD205: 5'-TAACGAAATTCATTAGCGGATCG-3'. The amplified product was cloned in pCR2.1-Topo (Invitrogen) resulting in pIJ82. The *iha* gene was subcloned from pIJ82 following digestion with EcoRV (NEB) and BamHI (Invitrogen). Ligation of the *iha*-containing fragment into the same sites of cloning vectors pACYC184, pBR322 and pBluescriptII-SK+ generated plasmids pIJ84, pIJ95 and pIJ106 respectively. *fepA* from MG1655 was PCR amplified using Elongase with the following primers: CMD127: 5'-GCCAAGCTTCGCGCAATTCGAGGCG-3' and CMD128: 5'-GAAAAGCTTAACCGCAGTCTGCGAGT-3'. The amplified product was digested with HindIII (NEB) and was cloned into vectors pACYC184 and pBR322, generating plasmids pIJ68 and pIJ97, respectively.

3.2.3.4 Growth in iron-limited medium. *E. coli* strain H5058 and its complemented derivatives, or strain UCB34 and derivatives, were grown at 37°C with agitation in NB supplemented with leucine (20µg/ml), tryptophan (20µg/ml), thiamine (1µg/ml), histidine (22µg/ml), proline (30µg/ml), shikimate (200µg/ml), appropriate antibiotics (chloramphenicol at 25µg/ml, tetracycline at 10µg/ml), and 75µM dipyriddy. Growth was measured by spectrophotometry (OD₆₀₀) each hour for nine hours and a final reading was taken after 24 h. Tests were performed in triplicate and cultures were verified by PCR after 24 h. Bacterial growth on plates was done using the same medium supplemented with 1.5 % agar, or 0.7 % for top agar, and 100 µM dipyriddy. Enterobactin and by-products were extracted using the method described by Winkelmann *et al* (59) with strain H5058 as the producer strain. Bacteria were pelleted and the supernatant was acidified with HCl to pH 1.5. Three extractions with ethyl acetate were made. These extractions were dehydrated with Na₂SO₄, evaporated, and resuspended in 1 ml of water. A 10 µl volume of the enterobactin extract was pipetted on each filter disk which was then placed on plates seeded with the test strain, and growth of different strains was assessed following overnight incubation at 37°C. A visible halo around the filter indicated growth.

3.2.3.5 Colicin sensitivity test. Colicin extracts were prepared as previously described (12). Strain H5058 and siderophore receptor-encoding derivatives were plated in top agar on TSA plates and were allowed to solidify. 10 µl of colicin extract was pipetted onto filter discs, which were placed on the surface of the seeded agar plates. A halo of growth inhibition around the filter indicated susceptibility to the colicin.

3.2.3.6 Adherence assays. Quantitative adherence assays were performed essentially as described (22, 46). T24 and 293 epithelial cells were grown to confluence in 24-well plates. *E. coli* ORN172 or ExPEC strain UCB34 and derivatives were grown on LB plates containing appropriate antibiotics and were resuspended in LB broth to an O.D.₆₀₀ of 0.5. Cells were washed twice with serum-free medium and were then incubated for one hour with 880 µl of fresh medium (with serum). Next, 20 µl of bacteria were added to 6 wells per strain (MOI approx. 1/60 -100) and bacteria/host cell contact was enhanced by a 5 min centrifugation at 600 X g. After two hours of incubation, three wells per strain were lysed by adding 100 µl of PBS- pH 7.4 containing 1 % wt/vol sodium deoxycholate (DOC). Lysates were then plated on LB agar with appropriate antibiotics. Bacteria present in these lysates represented total bacteria. Cells in the three other wells per strain were washed three times using serum-free medium and were then similarly lysed. Bacterial adherence was calculated as the number of bacteria after washes divided by total bacteria. Two or more independent experiments were done for each test. Statistical significance was calculated by an unpaired T-test (two-tailed). Qualitative assays were performed in exactly the same way, except that a cover glass was placed in the wells and cells were at 75% confluence. After final washes, cells were fixed and stained using the Diff-Quick stain set (Dade Behring), and were observed by light microscopy.

3.2.3.7 Construction of *iha* and *fur* mutants. A mutant *iha* allele was created as follows: a 1154 bp PCR fragment of *iha* was generated using primers CMD200: 5'-GGGCGGGATCCTGAATATCATTACCAGA-3' and CMD201: 5'-GTGCCGGATCCTTCCACACCATGCAAC-3'. The amplified product was digested with BamHI (Invitrogen) and was cloned in pACYC184, resulting in pIJ81. pIJ81 was digested with SacI (NEB), which introduced a 96 bp deletion in the middle of *iha*, and a

tetAR(B) cassette derived from *Tn10* (obtained from pYA3442 (20)) was ligated into the *SacI* sites, leading to pIJ83. The *iha::tetAR(B)* allele from pIJ83 was PCR amplified using primers CMD200 and CMD201 and was introduced into strain UCB34 by homologous recombination using the λ red recombinase method (17). An *iha* mutant strain, designated QT686, was confirmed by PCR using external primers flanking the *iha* allele. QT686 demonstrated no difference in growth rate, plasmid profile, extended virulence profile (39), or pulsed-field gel electrophoresis restriction digest band pattern of genomic DNA compared with the wild-type parent. A *fur* mutant of strain UCB34 was created as follows. Briefly, a $\Delta fur::cat$ allele derived from *E. coli* strain QC2517 (21) was amplified with primers CMD18: 5'-ATTCTAGACTGCTGCTGGGCATCCC-3' and CMD19: 5'-ACTCTAGACAC-TCCGACATCCCAAGC-3'. The $\Delta fur::cat$ containing amplicon was transferred to strain UCB34 by homologous recombination using the λ red recombinase method. A *fur* mutant of strain UCB34 was designated QT796.

3.2.3.8 Quantitative real-time RT-PCR. For expression analysis in NB medium, UCB34 and the $\Delta fur::cat$ derivative strain QT796 were grown for 3 h at 37°C with agitation. Approximately 3×10^7 CFU were pelleted by centrifugation for 5 min at room temperature and RNA was extracted from whole bacterial cells using Trizol reagent according to the manufacturer's instructions (Invitrogen). For cell culture conditions, bacterial cells were suspended in culture medium in the presence or absence of 293 epithelial cells as described above for the adherence assays. For bacteria/host cell interaction, no washes were done, medium was removed, and Trizol was added to the wells. Bacteria without cells were harvested by centrifugation. A 10-fold dilution was performed in Trizol followed by RNA extraction. RNA was submitted to a second precipitation using lithium chloride (Ambion) and was treated twice with the DNA-free kit (Ambion) to eliminate any genomic DNA. RNA concentrations were determined using a NanoDrop-1000 (NanoDrop Technologies), and 15 ng of total RNA were reverse transcribed in triplicate using random hexamers and Superscript II (Invitrogen). Real-time PCR was done using the Dynamo SYBR green qPCR kit (Finnzymes) according to the manufacturer's guidelines. 25 μ l reactions were performed using 1 μ l of cDNA template per reaction. A Rotor-Gene 3000 real-time PCR apparatus (Corbett Research) was used.

PCR conditions were an initial incubation step for 15 min at 95°C followed by 45 cycles of 20 sec at 95°C, 20 sec at 60°C, and 20 sec at 72°C. Melting curve analyses were performed after each reaction to ensure amplification specificity. Fold differences in transcript were calculated using the relative comparison method, and amplification efficacies of each primer set were verified as previously described (2, 54). RNA levels were normalized by using *rpoD* as the control gene (3, 47, 62). Statistical significance was calculated on ΔC_t with a paired t-test and P values were all < 0.0001. Primers used for real time PCR analysis were CMD306: 5'-GGCTGAATCTGCAGGAAAGCAACA-3' and CMD307: 5'-TGCAGGCTGACAGAATCATCCACA-3' for *iha*, CMD308: 5'-AGCTGACTGACAGCACCATCGTAA-3' and CMD309: 5'-AAACCTTGCGATATGTTTCAGCGCC-3' for *fepA* and CMD310: 5'-TCATGAAGCTCTGCGTTGAGCAGT-3' and CMD328: 5'-caattgccgcggtcaaccaggtat-3' for *rpoD*.

3.2.3.9 Mouse infection experiment. Fifteen mice were co-infected with a mixture of UCB34 and its isogenic *iha* mutant QT686 in an ascending UTI model (35, 36). After 48 h, mice were euthanized. Bacterial colonies recovered from tissues and urine, and from the initial inoculum suspension, were replica plated to LB agar plates with and without tetracycline, to determine the relative proportion of wild-type UCB34 vs *iha* mutant QT686 in each sample. Data from post-infection cultures (output ratios) were normalized to the input ratio. Statistical differences were calculated with the Wilcoxon matched pairs test (signed rank).

3.2.3.10 Nucleotide sequence accession number. The accession number of the complete nucleotide sequence for UCB34 *iha* is DQ211582.

3.2.4 RESULTS

3.2.4.1 *iha* is expressed by CGA strain UCB34 during UTI.

In order to identify genes expressed *in vivo* by CGA strain UCB34, mice were infected in a UTI model. RNA was extracted from infected kidneys and was used for SCOTS. This technique of bacterial transcript capture allowed us to determine that *iha* from UCB34 was expressed in the mouse kidneys. The 470 bp SCOTS fragment clone that was identified by sequencing was identical to a portion of the *iha* gene from strain CFT073. By using primers derived from the CFT073 and EDL933 *iha* sequences, the *iha* gene and promoter region were amplified from genomic DNA of strain UCB34 and were cloned. *iha* from strain UCB34 is nearly identical to *iha* from strain CFT073, demonstrating only a single non-synonymous nucleotide difference that results in a GLY⁵⁶⁵ to SER⁵⁶⁵ substitution in the predicted peptide sequence. A putative Fur box regulatory region located just 3' of the predicted -35 region was identified as shown in Fig. 3.1. In addition, a putative TonB box has already been identified at the beginning of Iha from strain EDL933 (56). The TonB box is also conserved in the predicted Iha proteins from strains UCB34 and CFT073. Iha has previously been reported to share 53% similarity to the siderophore receptor IrgA from *Vibrio cholerae* (56). Additionally, Iha demonstrates identity/similarity with a number of putative outer membrane receptors from recently completed genomes, as well as to characterized iron-regulated OMPs such as BfrA from *Bordetella bronchiseptica* (7), and CfrA from *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* (31). Known siderophore receptors from *E. coli* that share identity with Iha include CirA, FepA, and Iron (Table 3.2).

3.2.4.2 *iha* from UCB34 functions as a siderophore receptor in *E. coli* K-12 strain H5058.

Due to its similarity to other siderophore receptors, we wished to assess whether Iha from UCB34 was able to function as a siderophore receptor. First, a growth promotion experiment in iron-limited liquid medium was done using the *E. coli* K-12

strain H5058. H5058 produces enterobactin when supplemented with shikimate, but is defective in enterobactin uptake as it lacks siderophore receptors. It therefore grows poorly in iron-limited medium. Introduction of plasmid pIJ84 (*iha*) increased the growth of strain H5058 to levels similar to that of the positive control plasmid pIJ68 (*fepA*), which encodes the endogenous enterobactin siderophore receptor (Fig. 3.2). By contrast, H5058 containing only the vector grew poorly. In addition, we performed a cross-feeding experiment using the same strains that were tested in the liquid growth assay. Strain H5058 containing plasmids pIJ68 (*fepA*), pIJ84 (*iha*), or the vector control were seeded in top agar and overlaid onto iron-limited NB plates. A purified enterobactin extract was then added to filter disks that were placed on top of the plates. Growth halos were visible around the disks for strains containing either *fepA* or *iha*. H5058 harboring *fepA* (pIJ68) exhibited a slight increase in growth compared to the clone containing *iha* (pIJ84). No growth was observed for the negative control strain H5058 (pACYC184). These results indicate that *iha* can promote growth of a siderophore receptor-negative *E. coli* K-12 strain in iron-limited medium, presumably by allowing incorporation of enterobactin or its by-products.

To assess if the capacity of Iha to transport siderophores was dependent on the TonB complex, pIJ84 (*iha*) was introduced into a *tonB* mutant strain, BR158. As expected, no growth promotion of that strain could be observed in iron-depleted medium, suggesting that siderophore transport by Iha requires the TonB complex (data not shown).

3.2.4.3 *iha* does not confer susceptibility to colicins Ia and B.

Since some siderophore receptors are known portals for the entry of certain colicins (13), we assessed whether Iha confers susceptibility to two colicins that recognize siderophore receptors. Sensitivity to colicins Ia and B was determined for siderophore receptor-negative strain H5058 containing plasmid-encoded copies of *iha* or *fepA*. Colicin B targets the FepA enterobactin receptor, whereas colicin Ia targets the CirA receptor (13). An inhibition zone around the disk could be seen for both colicins in control strain *E. coli* MG1655, which produces both CirA and FepA. By contrast, strain

H5058 was resistant to these colicins (Table 3.3). Strain H5058 containing the *fepA* clone was as sensitive to colicin B as MG1655 and demonstrated slight sensitivity to colicin Ia. However, H5058 containing the *iha* clone demonstrated no sensitivity to either colicin B or Ia (Table 3.3), suggesting that Iha does not confer susceptibility to those two colicins.

3.2.4.4 Iha from UCB34 functions as an adhesin in *E. coli* K-12 strain ORN172.

In previous reports, introduction of Iha from strains EDL933 and CFT073, when cloned into a high-copy vector, conferred increased adherence of the poorly adhering *E. coli* K-12 *fim* mutant strain ORN172 to epithelial cells (37, 56). These results suggested that Iha may act directly (or indirectly) as an adhesin. As Iha shares sequence similarities with other siderophore receptors, we investigated the adherence phenotype of Iha as well as that of other siderophore receptors. Two types of cells were used: T24 human bladder epithelial cells and 293 human kidney epithelial cells.

Adhesion assays were performed using high-copy clones of *iha*, *fepA*, *cirA*, *iroN*, and *irgA*. Except for the *iha* containing clone (pIJ106), no increase in adherence was conferred by presence of any of the other siderophore receptors on high-copy plasmids (Fig. 3.3). To determine if plasmid copy number had an effect on adherence to epithelial cells, *iha* and *fepA* (as a control) were cloned into the medium-copy vector pBR322. Quantitative adherence assays were performed, and similar adherence results were obtained using the mid-copy clones or the high-copy clones. Bacteria containing *iha* adhered more avidly to 293 kidney epithelial cells when compared to T24 bladder epithelial cells (Fig. 3.4). That is, for kidney cells 33% of the initial bacterial numbers were recovered, compared to 13% recovery following adherence to T24 bladder cells ($P = 0.001$). ORN172 containing either a cloned copy of *fepA* or the pBR322 vector control demonstrated similarly low level adherence of about 5% recovery from kidney cells and 3% recovery from bladder cells. (Fig. 3.4). However, no difference in adherence was observed between (*iha*-positive) wild-type strain UCB34 and its $\Delta iha::tetAR(B)$ derivative strain QT686, with or without the addition of 2.5% mannose to the medium (data not shown).

As demonstrated in Fig. 3.1, the *iha* promoter region contains a predicted Fur-binding site. The presence of Fur binding sites on high copy plasmids has the potential to titrate the Fur regulatory protein and could result in the deregulated expression of many proteins in *E. coli* ORN172 that could potentially be responsible for increased adherence observed in previous studies (37, 56). To assess if Fur exerts a regulatory effect on adherence, a *fur* null mutant of strain UCB34 and ORN172 were constructed and used in adherence assays. No differences in adherence to epithelial cells were observed compared to the parental strains (data not shown).

3.2.4.5 *iha* expression is modulated by iron availability and Fur but not contact with host cells.

The expression level of *iha* by CGA strain UCB34 in different culture conditions was determined using real-time PCR experiments and was compared to the level of expression of *fepA*. The wild-type strain UCB34 and isogenic *fur* null mutant QT796 were grown in NB medium, iron-limited medium (NB supplemented with 75 μ M dipyridyl), or iron-replete medium (NB supplemented with FeCl₃ 30 μ M). Results shown in Fig. 3.5 represent the fold-increase in expression compared to the expression level of the wild-type strain grown in NB (fold-increase of 1). In strain UCB34, we observed a 12-fold increase in *iha* expression following growth in iron-depleted medium, compared to a 9-fold increase for *fepA*. In contrast, no expression for either *iha* or *fepA* was detectable in iron-replete medium. In the *fur* mutant QT796, regulation of both *iha* and *fepA* expression by iron was abrogated, since expression levels in iron-limited medium and NB were similar, and expression was also present in iron-replete medium.

In addition, the influence of bacterial interaction with host cells on the expression level of *iha* was investigated by real-time RT-PCR. In a representative adhesion assay, the level of expression by UCB34 was not any different following a 2 hour interaction with 293 cells in MEM medium than following a 2 hour incubation in MEM medium alone (data not shown).

3.2.4.6 Iha contributes to virulence of CGA strain UCB34 during UTI.

To assess if Iha contributes to virulence of the CGA strain in the mouse UTI model, dual strain competition infections were done in female CBA/J mice using wild-type strain UCB34 and its isogenic *iha::tetAR(B)* derivative QT686. Fifteen mice were challenged via the urethra under non-refluxing conditions. Fig. 3.6 shows the bacterial numbers for the wild-type or mutant strain in bladders, kidneys, and urine. Table 3.4 indicates the presence or absence of each strain per sample. Wild-type strain UCB34 significantly outcompeted the *iha* mutant at each site assessed (Fig. 3.6). For many of the samples only wild-type strain UCB34 was recovered, indicating a marked deficiency in persistence of the *iha* mutant in the host as compared to the wild-type parent strain.

3.2.5 DISCUSSION

In the current report, we have characterized Iha from strain UCB34, a representative of the recently emerged, antibiotic resistance-associated, and disseminated ExPEC clonal group that has been designated CGA. Our results demonstrate that Iha can function as both an adhesin and a siderophore receptor. Further, co-infection experiments between an *iha* null mutant and its isogenic parent demonstrated that Iha contributes to colonization and virulence in the mouse urinary tract. Iha thus represents the first characterized virulence factor for a CGA ExPEC strain.

Iha shares high identity/similarity with numerous putative and confirmed siderophore receptors of Gram-negative bacteria, including IrgA from *Vibrio cholerae*. It has typical characteristics of siderophore receptors such as a putative TonB interaction box at the N-terminal region (56) and a putative Fur-binding regulatory site in its promoter region (Fig. 3.1). Despite the fact that it has been described as an adhesin for two archetypal strains in other studies (37, 56), no similarity between Iha and other characterized adhesins can be found in the available sequence databases (August, 2005). Siderophore receptors have not typically been described or investigated as potential adhesins. Based on the considerable identity of Iha with siderophore receptors, we investigated whether four other siderophore receptor-encoding genes (*fepA*, *cirA*, *iroN*, and *irgA*), when cloned in high-copy vectors, could also confer adherence of *E. coli* ORN172 to the same uroepithelial cells. Among the five cloned siderophore receptors, only *iha* conferred increased adherence. The *iha* gene from CGA strain UCB34 conferred increased adherence of a poorly adherent *E. coli* K-12 strain to human bladder and kidney epithelial cells when cloned in a high-copy vector. These results confirmed those reported previously for Iha obtained from *E. coli* O157:H7 strain EDL933 and ExPEC strain CFT073 (37, 56), and showed that the single amino acid difference observed between the UCB34 and CFT073 Iha sequences does not affect this phenotype.

Importantly, the high-copy plasmids encoding siderophore receptors contain Fur boxes present in the promoter regions of the siderophore receptor-encoding genes.

Titration of the available Fur proteins due to the high number of Fur-binding sites present in the cell after introduction of a Fur regulated gene on a high-copy plasmid leads to deregulation and increased production of *fur* regulated gene products (57). Therefore, the adherence phenotype associated with the cloned copy of *iha* in ORN172 in the current and previous reports (37, 56) conceivably could have been due to derepression of Fur regulated genes, the products of which may encode cryptic adhesins present in *E. coli* K-12. However, since the plasmids encoding *fepA*, *cirA*, *iroN*, and *irgA* had no appreciable effect on adherence, the adherence phenotype due to the *iha*-encoding plasmid is unlikely to be a Fur-related artifact, and therefore is likely to be directly due to Iha. Further supporting this conclusion is the finding that a *fur* null mutant of strain ORN172 did not exhibit any increases in adherence to epithelial cells. In addition, when *iha* from UCB34 was cloned on the medium-copy cloning vector pBR322, the increase in adherence to epithelial cells was similar to what was observed with a high-copy clone. Hence, our results suggest that Iha confers an adhesin function which is lacking in other siderophore receptors. They also confirm previous results which determined that the IroN siderophore receptor does not contribute to adherence of ORN172 to epithelial cells (53).

Our data provide the first quantitative assessment of the Iha adhesion phenotype by determination of bacterial viable counts following interaction with both bladder and kidney-derived epithelial cell lines. Iha-mediated adherence was more extensive on human 293 kidney cells than on human T24 bladder cells (Fig. 3.4). These results, combined with the detection of *iha* expressed in the mouse kidney as determined by SCOTS and the fact that the CGA strain exhibited increased colonization in the kidneys compared to the bladder of infected mice (Fig. 3.6), suggest that *iha* may preferentially bind to kidney epithelial cells, at least in these conditions. Early epidemiological data suggested that CGA isolates are not more likely to cause ascending kidney infections compared to cystitis (44). However, this study only contained a small number of pyelonephritis cases, and the authors noted that the small sample size could have limited the detection of an association of CGA isolates with pyelonephritis. In contrast, in a subsequent study a statistically significant association of CGA with pyelonephritis was observed (unpublished results, J.R. Johnson). Unlike most archetypical ExPEC strains

such as CFT073, 536, and CP9, strain UCB34 is hemolysin-negative and demonstrates little cytotoxicity for host cells in culture. Accordingly, adherence assays to epithelial cells with strain UCB34 and derivatives could be undertaken without toxicity problems, in contrast to studies with strain CFT073 (37, 49). No difference in adherence phenotype was observed between UCB34 and the *iha* null mutant with either the bladder or kidney epithelial cell lines, in the presence or absence of mannose. UCB34 possesses other adhesins (e.g. *pap*), one or more of which may compensate in the *in vitro* adherence assays for loss of Iha. However, it is possible that Iha may provide a selective advantage for UCB34 to colonize certain tissues or host receptors *in vivo*.

Our results also demonstrate the previously hypothesized but unconfirmed role of Iha as a siderophore receptor. A cloned copy of *iha* was nearly as effective as a cloned copy of *fepA* in restoring growth of a siderophore receptor-negative enterobactin producing *E. coli* K-12 strain in iron-limited medium. We investigated this phenotype in two different experiments, i.e. with a growth curve in liquid culture medium and on agar plates with purified enterobactin and its by-products. Typically, siderophore-mediated iron uptake is TonB dependent. Since Iha possesses a predicted TonB interaction region, enterobactin-mediated growth promotion observed in iron-limited medium should be dependent on TonB. Consistent with this, introduction of a cloned copy of *iha* did not restore growth to an *E. coli* K-12 *tonB* mutant in iron-limited medium. In addition, unlike the native receptor of enterobactin FepA, Iha did not confer susceptibility to colicins B or Ia when tested with a cloned copy in a K-12 *fepA*, *cir* mutant strain (Table 3.3). This might be due to differences in sites that are critical for colicin uptake but which do not adversely affect catecholate siderophore transport. Overall, the results suggest that Iha is able to interact with the cyclic catecholate siderophore enterobactin or its breakdown products, which supports the potential role of Iha as a siderophore receptor. However, the *iha* mutant of UCB34 did not show any growth defect compared to its isogenic wild-type parent in iron-depleted medium. This is most likely due to the redundancy of iron acquisition systems present in most ExPEC strains, including CGA members, which typically possess the aerobactin and yersiniabactin systems (39).

At present, we cannot exclude the possibility that in the wild-type strain, there might be another as yet unidentified siderophore that is specific to Iha and that enterobactin uptake by Iha may only be ancillary. An example of a siderophore receptor that can mediate enterobactin uptake but that preferentially interacts with other siderophores is IroN. IroN is able to mediate enterobactin uptake and has been shown to be a urovirulence factor (53). However, the principle role of IroN is the specific uptake of salmochelins, which are glycosylated derivatives of enterobactin (33). IreA represents another virulence factor of ExPEC that is a putative siderophore receptor (51). Some potential advantages for siderophore receptor redundancy have been previously suggested and include the possibility that multiple acquisition systems may maximize iron uptake, and increase the ability of a pathogenic strain to acquire iron during host infection. In addition, some systems might be particularly adapted to specific conditions in different host niches during infection or permit utilization of siderophores produced by other bacterial species within the microbial flora during colonization of host tissues (51, 53).

To further investigate Iha as a potential iron-regulated siderophore receptor, we analysed *iha* expression as well as the expression of *fepA*, which encodes the enterobactin receptor, under different conditions of iron availability. As with *fepA*, *iha* expression levels increased when iron availability was reduced, and a repression of *iha* expression to below our detection limits was observed when iron was replete in the medium. An increase in expression of *fepA* in iron-limited medium has been previously reported (34, 47). However, in contrast to its responsiveness to iron concentrations, *iha* expression was not increased in cell adherence assays and is therefore apparently independent of cell-cell contact. Additionally, no expression of *iha* could be detected in LB medium (data not shown). This result is in accordance with that obtained by Johnson *et al* (37), who did not detect Iha protein by using western blot analysis following growth in LB. Since LB medium is iron rich, it is not surprising that growth in LB represses *iha* expression.

Fur, the “Ferric Uptake Regulator”, is a well established regulator of genes involved in iron homeostasis (1, 24). The DNA motif necessary for Fur to interact in the promoter region has been widely discussed. Depending on the model of how Fur interacts

with DNA, this motif has been described as a consensus sequence, two inverted palindromes, a repeat of hexamers, or a 7-1-7 inverted sequence, and all such models allow many mismatches (1, 4, 24). In the *iha* promoter region, 14 of 19 bases match with DeLorenzo's consensus sequence if a single nucleotide gap is present (Fig. 3.1). Such a sequence identity is likely to be permissive for Fur association, since Fur regulated genes with as low as 11 of 19 base identity with the consensus sequence have been identified by Fur titration assay (57). A larger potential Fur interacting site in the *iha* promoter region could be defined using the hexamer model (Fig. 3.1). As we identified a region upstream of the *iha* start codon that could be a Fur box for *iha* we investigated the role of Fur on *iha* expression by using quantitative PCR.

In the *fur* mutant of strain UCB34, *iha* and *fepA* expression were increased by 16- and 28-fold, respectively, when compared to the level of expression of *iha* and *fepA* by the wild-type strain in NB medium. Previous studies have reported differences in expression levels for *fepA* in an *E. coli fur* mutant compared to its parental strain, and differences in the level of Fur-regulated gene expression can vary depending on the technique used. A 2.5-fold and 64.5-fold increase has been observed using microarrays and real-time PCR, respectively (62), and a 7.05-fold increase was determined using a macroarray (47). In both of these reports higher sensitivity was obtained using real-time PCR when compared with DNA arrays. Higgs *et al.* reported a 23-fold expression increase with a *fur*-negative strain using protein quantification (34). Although these studies used *E. coli* K-12 strains grown either in LB or M9 medium, whereas we analyzed Fur-dependent expression in a wild-type ExPEC strain grown in NB, our results are consistent with other studies. In the UCB34 *fur* mutant, *iha* and *fepA* expression was constitutive and became less influenced by iron availability. In the *fur* mutant, the change in expression was more marked for *fepA* than for *iha*. Based on these results the Fur regulator may bind to the *fepA* Fur box more avidly than to the *iha* Fur box. Alternatively, *iha* may be co-regulated by other proteins in addition to Fur. In either case, it is clear that inactivation of the *fur* gene has an effect on *iha* expression.

The ability of CGA strain UCB34 to colonize the mouse urinary tract is significantly lower for a UCB34 *iha* null mutant than for the wild-type strain as demonstrated by competitive infections. This result confirmed the importance of *iha* *in vivo*. Iha is the first virulence factor to be demonstrated as important for a representative of CGA, or for any phylogenetic group D strain, in the mouse UTI model. In conclusion, Iha may be a dual-function urovirulence factor for *E. coli* CGA strains and other pathogenic *E. coli*. Our work demonstrated that Iha is expressed by a CGA ExPEC strain *in vivo* during UTI in the mouse, and that Iha is an important virulence factor for the establishment of UTI. Iha increased both *in vitro* adherence to uroepithelial cells and enterobactin-mediated iron uptake in *E. coli* K-12 strains lacking other siderophore receptors. Iha expression was regulated by iron availability and the Fur regulator. Whether the adhesin phenotype, the siderophore receptor activity, or both traits are important *in vivo* remains to be determined.

3.2.6 ACKNOWLEDGEMENTS

Kind thanks to A.R. Manges, E.E. Wyckoff, K. Hantke, P.E. Orndorff and M. Cellier for the gift of strains or plasmids. S. L. was funded by a Fonds de recherches en Santé du Québec (FRSQ) Master's level scholarship and M. C. by a Fondation Armand-Frappier scholarship. Funding for this project was provided to CMD by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) and the Canadian Foundation for Innovation and to J.R.J. by the Office of Research and Development, Medical Research Service, Department of Veterans Affairs.

3.2.7 REFERENCES

1. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-37.
2. **Anonymous.** 1997. Applied Biosystems user bulletin 2. The Perkin-Elmer Corp., Norwalk, Conn.
3. **Bader, M. W., W. W. Navarre, W. Shiau, H. Nikaido, J. G. Frye, M. McClelland, F. C. Fang, and S. I. Miller.** 2003. Regulation of *Salmonella typhimurium* virulence gene expression by cationic antimicrobial peptides. *Mol Microbiol* **50**:219-30.
4. **Baichoo, N., and J. D. Helmann.** 2002. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**:5826-32.
5. **Bauer, R. J., L. Zhang, B. Foxman, A. Siitonen, M. E. Jantunen, H. Saxen, and C. F. Marrs.** 2002. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *ironE. coli*. *J Infect Dis* **185**:1521-4.
6. **Baumler, A. J., T. L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch, and F. Heffron.** 1998. IronN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *J Bacteriol* **180**:1446-53.
7. **Beall, B., and T. Hoenes.** 1997. An iron-regulated outer-membrane protein specific to *Bordetella bronchiseptica* and homologous to ferric siderophore receptors. *Microbiology* **143 (Pt 1)**:135-45.
8. **Bingen-Bidois, M., O. Clermont, S. Bonacorsi, M. Terki, N. Brahim, C. Loukil, D. Barraud, and E. Bingen.** 2002. Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infect Immun* **70**:3216-26.
9. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-74.
10. **Bolivar, F., R. L. Rodriguez, P. J. Greene, M. C. Betlach, H. L. Heyneker, and H. W. Boyer.** 1977. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* **2**:95-113.
11. **Bower, J. M., D. S. Eto, and M. A. Mulvey.** 2005. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* **6**:18-31.
12. **Brickman, T. J., and S. K. Armstrong.** 1996. Colicins B and Ia as novel countersensitive agents in interspecies conjugal DNA transfers from colicin-sensitive *Escherichia coli* donors to other gram-negative recipient species. *Gene* **178**:39-42.
13. **Cao, Z., and P. E. Klebba.** 2002. Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins. *Biochimie* **84**:399-412.
14. **Chain, P. S., E. Carniel, F. W. Larimer, J. Lamerdin, P. O. Stoutland, W. M. Regala, A. M. Georgescu, L. M. Vergez, M. L. Land, V. L. Motin, R. R. Brubaker, J. Fowler, J. Hinnebusch, M. Marceau, C. Medigue, M. Simonet, V. Chenal-Francois, B. Souza, D. Dacheux, J. M. Elliott, A. Derbise, L. J.**

- Hauser, and E. Garcia.** 2004. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13826-31.
15. **Chang, A. C., and S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**:1141-56.
 16. **Daigle, F., J. Y. Hou, and J. E. Clark-Curtiss.** 2002. Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Methods Enzymol* **358**:108-22.
 17. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-5.
 18. **Deng, W., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, A. Boutin, G. F. Mayhew, P. Liss, N. T. Perna, D. J. Rose, B. Mau, S. Zhou, D. C. Schwartz, J. D. Fetherston, L. E. Lindler, R. R. Brubaker, G. V. Plano, S. C. Straley, K. A. McDonough, M. L. Nilles, J. S. Matson, F. R. Blattner, and R. D. Perry.** 2002. Genome sequence of *Yersinia pestis* KIM. *J Bacteriol* **184**:4601-11.
 19. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:247-52.
 20. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, 3rd.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**:4145-54.
 21. **Dubrac, S., and D. Touati.** 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J Bacteriol* **182**:3802-8.
 22. **Elsinghorst, E. A.** 1994. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* **236**:405-20.
 23. **Emody, L., M. Kerenyi, and G. Nagy.** 2003. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Antimicrob Agents* **22 Suppl 2**:29-33.
 24. **Escolar, L., J. Perez-Martin, and V. de Lorenzo.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**:6223-9.
 25. **Finer, G., and D. Landau.** 2004. Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis* **4**:631-5.
 26. **Foxman, B.** 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* **113 Suppl 1A**:5S-13S.
 27. **France, A. M., K. M. Kugeler, A. Freeman, C. A. Zalewski, M. Blahna, L. Zhang, C. F. Marrs, and B. Foxman.** 2005. Clonal groups and the spread of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Infect Dis* **40**:1101-7.
 28. **Goldberg, M. B., S. A. Boyko, J. R. Butters, J. A. Stoebner, S. M. Payne, and S. B. Calderwood.** 1992. Characterization of a *Vibrio cholerae* virulence factor homologous to the family of TonB-dependent proteins. *Mol Microbiol* **6**:2407-18.

29. **Gordon, D. M., S. E. Stern, and P. J. Collignon.** 2005. Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits. *Microbiology* **151**:15-23.
30. **Griggs, D. W., B. B. Tharp, and J. Konisky.** 1987. Cloning and promoter identification of the iron-regulated *cir* gene of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **169**:5343-52.
31. **Guerry, P., J. Perez-Casal, R. Yao, A. McVeigh, and T. J. Trust.** 1997. A genetic locus involved in iron utilization unique to some *Campylobacter* strains. *J Bacteriol* **179**:3997-4002.
32. **Gupta, K., T. M. Hooton, and W. E. Stamm.** 2001. Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann Intern Med* **135**:41-50.
33. **Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch, and G. Winkelmann.** 2003. Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:3677-82.
34. **Higgs, P. I., R. A. Larsen, and K. Postle.** 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Mol Microbiol* **44**:271-81.
35. **Johnson, J. R., T. Berggren, and J. C. Manivel.** 1992. Histopathologic-microbiologic correlates of invasiveness in a mouse model of ascending unobstructed urinary tract infection. *J Infect Dis* **165**:299-305.
36. **Johnson, J. R., and J. J. Brown.** 1996. Defining inoculation conditions for the mouse model of ascending urinary tract infection that avoid immediate vesicoureteral reflux yet produce renal and bladder infection. *J Infect Dis* **173**:746-9.
37. **Johnson, J. R., S. Jelacic, L. M. Schoening, C. Clabots, N. Shaikh, H. L. Mobley, and P. I. Tarr.** 2005. The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* **73**:965-71.
38. **Johnson, J. R., A. R. Manges, T. T. O'Bryan, and L. W. Riley.** 2002. A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis. *Lancet* **359**:2249-51.
39. **Johnson, J. R., A. C. Murray, M. A. Kuskowski, S. Schubert, M. F. Prere, B. Picard, R. Colodner, and R. Raz.** 2005. Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A. *Emerg Infect Dis* **11**:141-5.
40. **Johnson, J. R., T. T. O'Bryan, P. Delavari, M. Kuskowski, A. Stapleton, U. Carlino, and T. A. Russo.** 2001. Clonal relationships and extended virulence genotypes among *Escherichia coli* isolates from women with a first or recurrent episode of cystitis. *J Infect Dis* **183**:1508-17.
41. **Johnson, J. R., T. A. Russo, P. I. Tarr, U. Carlino, S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., and A. L. Stell.** 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN_{E. coli}*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* **68**:3040-7.
42. **Kanamaru, S., H. Kurazono, S. Ishitoya, A. Terai, T. Habuchi, M. Nakano, O. Ogawa, and S. Yamamoto.** 2003. Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kpsMT*, *ompT* and *usp* in

- Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. J Urol **170**:2490-3.
43. **Lundrigan, M. D., and R. J. Kadner.** 1986. Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB. J Biol Chem **261**:10797-801.
 44. **Manges, A. R., P. S. Dietrich, and L. W. Riley.** 2004. Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired pyelonephritis. Clin Infect Dis **38**:329-34.
 45. **Manges, A. R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton, and L. W. Riley.** 2001. Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. N Engl J Med **345**:1007-13.
 46. **Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner, and S. J. Hultgren.** 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. Embo J **19**:2803-12.
 47. **McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper, and S. C. Andrews.** 2003. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. J Biol Chem **278**:29478-86.
 48. **Mey, A. R., E. E. Wyckoff, A. G. Oglesby, E. Rab, R. K. Taylor, and S. M. Payne.** 2002. Identification of the *Vibrio cholerae* enterobactin receptors VctA and IrgA: IrgA is not required for virulence. Infect Immun **70**:3419-26.
 49. **Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockett, B. D. Jones, and J. W. Warren.** 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. Infect Immun **58**:1281-9.
 50. **Parkhill, J., B. W. Wren, K. Mungall, J. M. Ketley, C. Churcher, D. Basham, T. Chillingworth, R. M. Davies, T. Feltwell, S. Holroyd, K. Jagels, A. V. Karlyshev, S. Moule, M. J. Pallen, C. W. Penn, M. A. Quail, M. A. Rajandream, K. M. Rutherford, A. H. van Vliet, S. Whitehead, and B. G. Barrell.** 2000. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature **403**:665-8.
 51. **Russo, T. A., U. B. Carlino, and J. R. Johnson.** 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. Infect Immun **69**:6209-16.
 52. **Russo, T. A., U. B. Carlino, A. Mong, and S. T. Jodush.** 1999. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. Infect Immun **67**:5306-14.
 53. **Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard, and J. R. Johnson.** 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. Infect Immun **70**:7156-60.
 54. **Schmittgen, T. D., B. A. Zakrajsek, A. G. Mills, V. Gorn, M. J. Singer, and M. W. Reed.** 2000. Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. Anal Biochem **285**:194-204.
 55. **Song, Y., Z. Tong, J. Wang, L. Wang, Z. Guo, Y. Han, J. Zhang, D. Pei, D. Zhou, H. Qin, X. Pang, Y. Han, J. Zhai, M. Li, B. Cui, Z. Qi, L. Jin, R. Dai, F.**

- Chen, S. Li, C. Ye, Z. Du, W. Lin, J. Wang, J. Yu, H. Yang, J. Wang, P. Huang, and R. Yang.** 2004. Complete genome sequence of *Yersinia pestis* strain 91001, an isolate avirulent to humans. *DNA Res* **11**:179-97.
56. **Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor, and T. E. Besser.** 2000. Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**:1400-7.
57. **Vassinova, N., and D. Kozyrev.** 2000. A method for direct cloning of fur-regulated genes: identification of seven new fur-regulated loci in *Escherichia coli*. *Microbiology* **146 Pt 12**:3171-82.
58. **Warren, J. W., E. Abrutyn, J. R. Hebel, J. R. Johnson, A. J. Schaeffer, and W. E. Stamm.** 1999. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA). *Clin Infect Dis* **29**:745-58.
59. **Winkelmann, G., A. Cansier, W. Beck, and G. Jung.** 1994. HPLC separation of enterobactin and linear 2,3-dihydroxybenzoylserine derivatives: a study on mutants of *Escherichia coli* defective in regulation (*fur*), esterase (*fes*) and transport (*fepA*). *Biometals* **7**:149-54.
60. **Woodall, L. D., P. W. Russell, S. L. Harris, and P. E. Orndorff.** 1993. Rapid, synchronous, and stable induction of type 1 piliation in *Escherichia coli* by using a chromosomal *lacUV5* promoter. *J Bacteriol* **175**:2770-8.
61. **Zhang, L., B. Foxman, and C. Marrs.** 2002. Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol* **40**:3951-5.
62. **Zhang, Z., G. Gosset, R. Barabote, C. S. Gonzalez, W. A. Cuevas, and M. H. Saier, Jr.** 2005. Functional interactions between the carbon and iron utilization regulators, Crp and Fur, in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **187**:980-90.

3.2.8 TABLES

TABLE 3.1. *E. coli* strains and plasmids

Strain or plasmid	Characteristics	Source
Strains		
H5058	<i>aroB tsx malT cirA fepA fiu</i>	(6)
MG1655	F λ <i>rph-1</i>	(9)
ORN172	<i>thr-1 leu-6 thi-1</i> Δ (<i>argF-lac</i>)U169 <i>xyl-7 ara-13 mtl-2 gal-6</i> <i>rspL tonA2 minA minB</i> Δ (<i>fimEACDFGH</i>) :: <i>kan pilG1</i>	(60)
QT686	UCB34 Δ <i>iha</i> :: <i>tetAR(B)</i> , Tc ^R	This study
QT796	UCB34 Δ <i>fur</i> :: <i>cat</i> Cm ^R	This study
UCB34	O17/77 ExPEC CGA isolate (cystitis)	Amee Manges (45)
Plasmids		
pACYC184	p15A replicon, Tc ^R , Cm ^R	(15)
pBluescript SK+	pUC replicon, Ap ^R	Stratagene
pBR322	pMB1 replicon, Ap ^R , Tc ^R	(10)
pC6	<i>E. coli rrnB</i> operon in pBR322, Ap ^R	C. Squires
pCR2.1-TOPO	pUC replicon, Ap ^R , Km ^R	Invitrogen
pIJ68	MG1655 <i>fepA</i> in pACYC184, Cm ^R	This study
pIJ82	UCB34 <i>iha</i> in pCR2.1-TOPO, Ap ^R , Km ^R	This study
pIJ83	<i>iha</i> :: <i>tetAR(B)</i> in pACYC184, Cm ^R	This study
pIJ84	UCB34 <i>iha</i> in pACYC184, Cm ^R	This study
pIJ95	UCB34 <i>iha</i> in pBR322, Ap ^R	This study
pIJ97	MG1655 <i>fepA</i> in pBR322, Ap ^R	This study
pIJ106	UCB34 <i>iha</i> in pBluescript, Ap ^R	This study
pKD46	pSC101 Ts replicon, <i>araBp-gam-bet-exo</i> , Ap ^R	(17)

Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Tc, tetracycline

TABLE 3.2. Protein sequence Identity-similarity to Iha

Siderophore receptor	Species	%	%	Accession number	References
		Identity	Similarity		
CirA2 putative outer membrane receptor	<i>Yersinia pestis</i> and <i>pseudotuberculosis</i>	55.4	73.2	AAM84435 AAS60620 CAH20032	(14, 18, 55)
CfrA	<i>Campylobacter jejuni</i> and <i>coli</i>	35.0	54.5	CAB73021 AAC45421	(31, 50)
IrgA	<i>Vibrio cholerae</i>	34.9	51.6	AAC44766	(28, 48)
BfrA	<i>Bordetella bronchiseptica</i>	34.8	50.7	AAB51774	(7)
CirA	<i>Escherichia coli</i>	30.8	46.0	AAA23581	(30)
FepA	<i>Escherichia coli</i>	27.3	44.1	AA65994	(43)
IroN	<i>Escherichia coli</i>	26.8	44.2	AAF00587	(52, 53)

^a Emboss Pairwise Alignment, full length sequence alignments obtained using Needle, EBI.

TABLE 3.3. Colicin sensitivity of *iha* and *fepA* clones in *E. coli* K-12 strain H5058 *fepA cirA* compared to *E. coli* K-12 strain MG1655 (*fepA*+ *cirA*+).

Strain	Colicin	
	B	Ia
H5058 pIJ84 (<i>iha</i>)	-	-
H5058 pIJ68 (<i>fepA</i>)	++	+
H5058 pACYC184	-	-
MG1655	++	++

- : no growth inhibition
+ : minor growth inhibition
++ : major growth inhibition

TABLE 3.4. Bacterial recovery from infected tissues and urine of mice infected with wild-type UCB34 and UCB34 *iha* mutant QT686.^a

	Wt only	Wt > <i>iha</i> -	Wt < <i>iha</i> -	<i>iha</i> - only	negative
Urine (n = 10) ^b	6	1	1	0	2
Bladder (n = 15)	7	4	1	1	2
Kidneys (n = 30)	10	3	3	0	14

Wt : UCB34 and *iha*- : QT686 (UCB34 *iha*-)

^aData were normalized to the input ratio.

^bUrine was only available for 10 mice

3.2.9 FIGURES

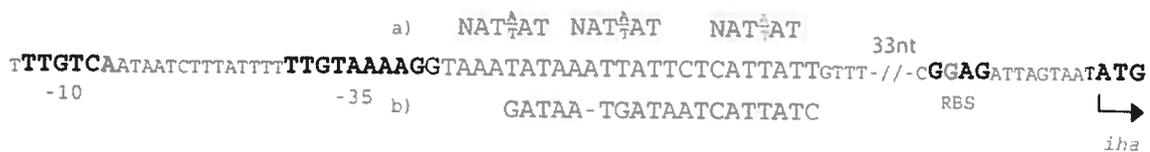


FIG. 3.1. Sequence of the predicted *iha* promoter region. A putative Fur box regulatory region is indicated based on identities to either the hexamer model (a) or deLorenzo's consensus (b) (24). Identities are indicated in shaded text.

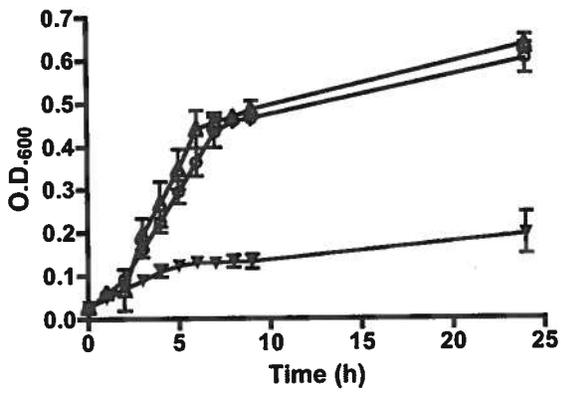


FIG. 3.2. Growth of *E. coli* K-12 siderophore receptor-negative strain H5058 containing recombinant *iha* (pIJ84, ○), *fepA* (pIJ68, Δ), or the control vector (pACYC184, ▼), in iron-limited medium (NB+75μM dipyrityl).

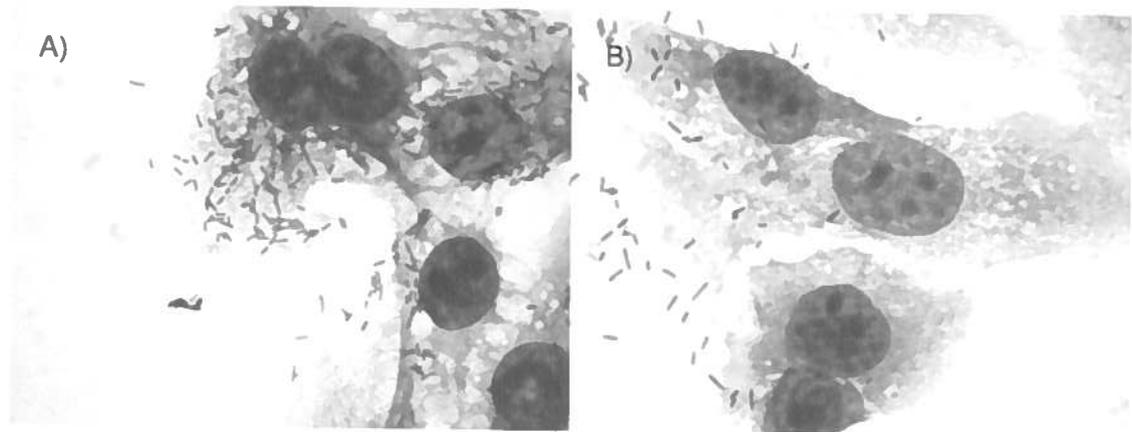


FIG. 3.3. T24 epithelial bladder cells after interaction with the poorly adherent *E. coli* K-12 *fim* mutant strain ORN172 containing *iha* (pIJ106) (panel A) or the control vector pBluescript II SK (panel B). Strain ORN172 containing plasmids encoding siderophore receptors *fepA*, *iroN*, *cirA*, and *irgA* demonstrated adherence similar to the control vector, i.e. panel B (not shown).

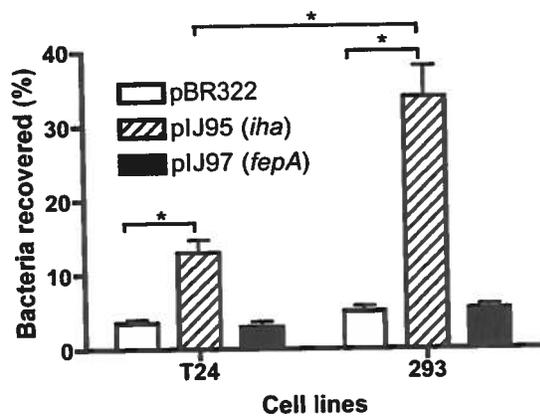


FIG. 3.4. Quantitative adherence of *E. coli* K-12 *fim*- ORN172 containing *iha* (pIJ95) or *fepA* (pIJ97) cloned on a medium-copy vector (pBR322), or control vector pBR322. T24 cells are bladder epithelial cells and 293 cells are kidney epithelial cells. *P ≤ 0.001.

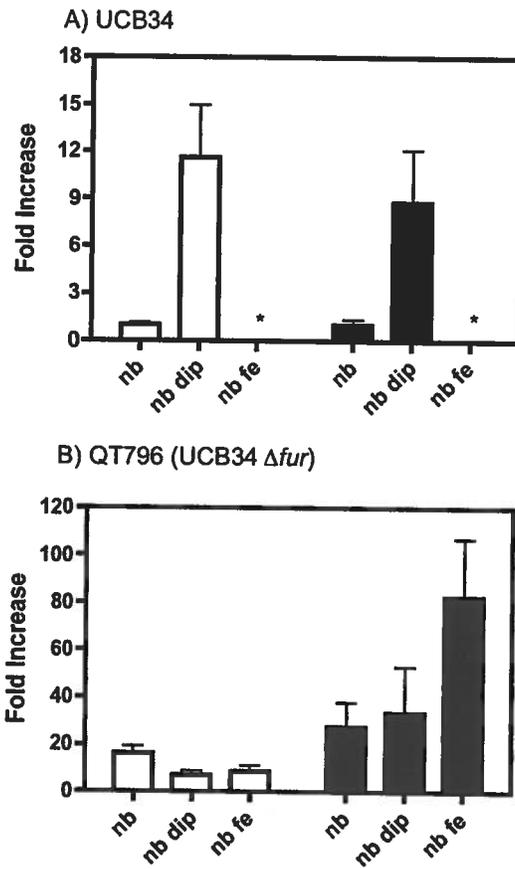


FIG. 3.5. Expression level of *iha* (□) and *fepA* (■), as determined by real-time PCR in different culture conditions for wild-type strain UCB34 (A) and its *fur* derivative QT796 (B). Results are presented as fold difference in expression levels compared to the wild-type UCB34 strain grown in NB (fold increase of 1), (nb dip: NB dipyrityl 75 μ M and nb fe: NB FeCl₃ 30 μ M). *No expression could be detected.

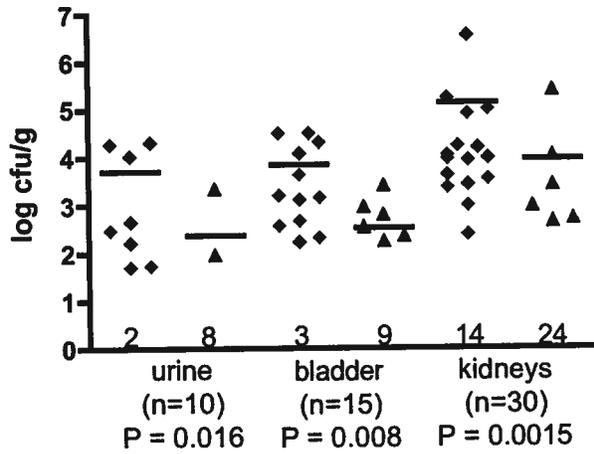


FIG. 3.6. Bacterial numbers (log cfu/g) present in the urine, bladder, and kidneys of mice co-infected with wild-type strain UCB34 (◆) and isogenic *iha* mutant QT686 (▲). Data points represent bacterial adjusted counts (normalized with the input ratio) from tissues and urine isolated from different mice. Horizontal bars represent the means. Numbers near the log 0 limit indicate samples in which no bacteria were detected. Urine samples were available for only 10 mice. Statistical analysis was done using the Wilcoxon matched pairs test. P values represent statistical significance between the wild-type and the mutant in each samples.

3.3 Accusé de réception

De: JournalsRR@asmusa.org
Date: mar. 20/09/2005 12:34
À: Dozois, Charles
Objet : Manuscript submission (IAI01544-05 Version 1)

Dear Dr. Dozois:

Re: Iha from an Escherichia coli UTI Outbreak Clonal Group A Strain is Expressed In Vivo in the Mouse Urinary Tract and Functions as a Siderophore Receptor and Adhesin (IAI01544-05 Version 1)

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is IAI01544-05 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is dozois. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: <http://www.asm.org/journals/editors.asp>

In submitting your manuscript to Infection and Immunity (IAI), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere.

By publishing in the journal, the authors agree that any plasmids, viruses, and living materials such as microbial strains and cell lines newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes.

If your manuscript is accepted for publication, a condition of acceptance is that you assign copyright to the American Society for Microbiology. A copyright transfer agreement is sent with each letter of acceptance after the manuscript has been scheduled for publication.

If your manuscript is accepted for publication in a 2005 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$60 per page for the first six pages and \$75 for each page in excess of six for a corresponding author who is an ASM member or \$69 per page for the first six pages and \$86 for each page in excess of six for a nonmember corresponding author. To obtain the member rate, a member corresponding author must include his 2005 member number on the reprint/page charge form that will be included with the proofs. To obtain the member rate, a nonmember corresponding author should complete the ASM membership application available online at <http://www.asm.org/MemberShip> and submit it and payment of the membership fee to ASM. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals, at the following address: Journals Department, American Society for Microbiology 1752 N St., NW, Washington, DC 20036. The fax number is 202-942-9355. The request must indicate how the work was financed and must be accompanied by copies of the title page and the Acknowledgments section of the paper.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Diane Smith
Production Editor
Infection and Immunity (IAI)

Chapitre IV

Discussion

L'absence de plusieurs facteurs de virulence classiques chez le groupe CGA laisse supposer la présence d'autres facteurs leur permettant d'établir une infection. Nous avons employé deux techniques pour tenter d'identifier de tels gènes ou facteurs de virulence : SCOTS et l'hybridation soustractive. Suite à ces investigations, deux facteurs de virulence potentiels ont été choisis pour une plus ample caractérisation soit Iha et le SSTT ETT2.

4.1 SCOTS et Iha

L'expérimentation à l'aide de la technique de SCOTS a nécessité plusieurs mois de travail, débutant avec l'infection des souris en février jusqu'à la réception des premières séquences de clones de fragments d'ADNc en juillet. Le rendement obtenu à l'aide de cette technique a été très décevant. Nous espérions obtenir plusieurs clones correspondant à des transcrits uniques de la souche UCB34 par rapport à la souche MG1655. Parmi ces clones espérés, nous supposons qu'une proportion correspondrait à des facteurs de virulence absents des souches UPEC classiques comme CFT073. Ce ne fut pas le cas et le seul clone pathospécifique que nous avons obtenu correspondait à un gène présent chez la souche typique CFT073. À ce moment, par contre, il n'avait pas encore été décrit dans le modèle UPEC et il restait encore beaucoup à faire pour élucider sa fonction et le classer comme facteur de virulence. La plupart des travaux effectués sur ce système ont été présentés dans l'article au précédent chapitre. Les autres clones ont été des clones correspondant à des ARNr bactériens ainsi que des ARNm de souris. Les ADNc correspondant à des ARNr bactériens auraient dû être éliminés par la technique et ce, malgré leur grand nombre. Pour une raison inconnue, il en est resté une bonne proportion. Malgré l'efficacité prouvée de la technique de SCOTS, ce n'est pas la première fois que cela se produit puisque d'autres expériences à l'aide de cette technique ont déjà échoué à faire disparaître les transcrits d'ARNr (communication personnelle avec le Dr. France Daigle). La raison pour laquelle des fragments d'ADNc correspondant à des transcrits d'ARNm de souris n'ont pas été éliminés par la technique est également difficile à expliquer.

Devant ce résultat, nous avons répété les trois premières étapes de capture à partir du même ARN de départ isolé des reins de souris. Après les premières étapes de capture, nous avons effectué une étape de vérification par une hybridation de type Southern comme dans la précédente expérimentation (voir section 2.1.1). Encore une fois, cette étape nous indiqua une faible diversité de la banque de fragments SCOTS, ce qui laissait présager des résultats similaires à ceux obtenus avec la première banque de clones. Nous n'avons donc pas poursuivi cette deuxième tentative plus loin. Par contre, elle nous indique que la faible diversité de la banque ne semble pas venir d'une erreur de manipulation lors des étapes de SCOTS.

Quelques hypothèses peuvent être avancées pour tenter d'expliquer le faible rendement. Premièrement, une dégradation de l'ARN bactérien suite à l'extraction de l'ARN total a pu se produire. Ce qui nous semble une explication très plausible puisque l'ARNm bactérien est très instable (Daigle *et al.*, 2002; Handfield et Levesque, 1999). Avec un faible nombre de fragment d'ADNc correspondant à des ARNm bactériens dès le départ, la technique peut avoir conservé des ADNc qui auraient dû être éliminés. Étant donné les étapes de PCR, si on ne retrouve pratiquement pas d'ADNc correspondant à des transcripts bactériens, il est possible que des ADNc eucaryotes, soit amplifié et qu'ils deviennent de plus en plus nombreux. La seconde explication est le faible nombre de bactéries présentes dans les organes infectés. Les reins de souris employés contenaient entre 1.8×10^3 et 2.0×10^4 bactéries totales soit entre 2.6 et 40.0×10^4 bactéries par gramme d'organe. Il est possible que ce nombre de bactéries ou cette proportion par rapport au poids de l'organe soit inférieur à la limite ou encore très près de la limite du nombre nécessaire pour pouvoir capter les transcripts d'ARNm par SCOTS. On peut également penser qu'à cause de ce faible nombre de bactéries, lors de l'étape de précipitation pour l'extraction de l'ARN, il n'y ait eu qu'un pourcentage limité d'ARNm bactérien précipité et isolé.

Malgré le faible rendement fournit par la technique de SCOTS, un système a été identifié comme étant exprimé *in vivo* et il a été caractérisé plus en profondeur. Nos travaux ont montré qu'un mutant *iha* de la souche UCB34 est atténué dans le modèle

d'IU murin (voir fig. 3.6 et tableau 3.4). Ce résultat nous permet d'identifier Iha comme un facteur de virulence chez une souche UPEC. La preuve irréfutable que ce facteur est impliqué dans la pathogénicité de cette souche serait de remettre le gène *iha* chez la souche mutante et observer un regain de virulence au même niveau que la souche sauvage. Cette preuve permettrait de remplir le dernier postulat moléculaire de Koch' tel que décrit par le Dr. Falkow stipulant que la réinsertion du gène chez la souche mutante devrait correspondre avec le retour de la pathogénicité (Falkow, 2004). Deux tentatives dans le but d'atteindre cet objectif ont été infructueuses. Il est possible que la mutation du gène *iha* engendre des changements d'expression de gènes à proximité, ce qui pourrait expliquer l'incapacité à compléter la mutation. Il est à noter que le gène *iha* ne se trouve pas au même endroit sur le chromosome chez les différentes souches où l'on peut le détecter. Néanmoins, tel que rapporté récemment par Buckles *et al.*, le nombre de facteurs de virulence chez les UPEC pour qui ce postulat a été rempli est très faible et se limite aux fimbriae type 1, la protéine TonB, le régulateur transcriptionnel RfaH ainsi que la toxine CNF1 (Buckles, 2004). Ceci n'empêche pas que plusieurs autres facteurs chez les UPEC sont considérés comme des facteurs de virulence sans que cette dernière preuve ne soit apportée. Nos données ont contribué à établir Iha comme un facteur de virulence non seulement en confirmant qu'un mutant *iha* chez une souche UPEC est atténué dans une expérience indépendante de la précédente (Johnson *et al.*, 2005a) mais également en apportant la preuve que ce facteur est exprimé *in vivo* dans un modèle murin.

4.2 L'hybridation soustractive et le système ETT2

Dans le but d'obtenir un plus grand rendement que celui atteint par SCOTS, nous avons entrepris d'effectuer une hybridation soustractive pour trouver des fragments pathospécifiques au groupe CGA. Cette fois, le taux de succès de capture de fragments d'ADN uniques à la souche d'intérêt a été excellent. Une quarantaine de clones uniques ont pu être isolés, séquencés et comparés aux banques de données (voir Tableau 2.1). Parmi ceux-ci, une grande proportion correspond à des gènes possédant des fonctions plasmidiques comme les gènes *mob*. Les gènes *mobBDA* sont impliqués dans la mobilisation de plasmides (Snyder et Champness, 1997). Ce résultat est dû au fait que la

souche UCB34 possède deux grands plasmides alors que la souche CFT073 n'en possède pas (Welch *et al.*, 2002). Comme les plasmides sont déjà en plus grand nombre de copies que le chromosome, il est normal que l'extrait d'ADN génomique de la souche UCB34 comporte un grand nombre de fragment d'ADN provenant des plasmides. Étant donné que la souche CFT073 ne possède aucun plasmide, ces fragments d'ADN ne sont pas éliminés, ce qui se reflète dans la quantité de clones leur correspondant. D'ailleurs, la répétition de quelques clones ou du gène représenté par différents clones est possiblement dû à sa localisation plasmidique. Une deuxième série de gènes captés correspond à des gènes du métabolisme général de la bactérie, qui sont différents ou semblable à ceux la souche CFT073. Ces deux premiers groupes de gènes ne sont pas d'un très grand intérêt en ce qui concerne la découverte de facteurs de virulence.

Un troisième groupe de gènes identifiés correspond à soit des facteurs de virulence potentiels ou encore des portions d'ADN avec des cadres de lecture ouverts hypothétiques. Parmi ceux-ci, on retrouve deux transporteurs de type ABC hypothétiques. D'autres clones possèdent des homologies avec des gènes hypothétiques de d'autres bactéries pour lesquels aucune fonction n'a encore été rapportée. Malgré leur potentiel intérêt quant à la virulence, la caractérisation de ces gènes est un peu hasardeuse puisqu'aucune donnée n'indique que ces gènes sont exprimés et fonctionnels. De plus, la recherche d'un phénotype peut être assez laborieuse puisqu'aucune hypothèse basée sur les homologies de séquences ne peut être avancée. Parmi la banque de clones séquencés plusieurs correspondaient à un fragment d'un contig du génome de *Citrobacter rodentium* (Chaudhuri *et al.*, 2004). Ceux-ci étaient répartis sur environ 30kb. Nous avons émis l'hypothèse que ce fragment du génome de *C. rodentium* se retrouve peut-être sur un des plasmides. Un autre gène qui a été retrouvé chez plusieurs clones différents est une protéine hypothétique conservée de *Legionella pneumophila*. Encore une fois, la caractérisation de ce gène hypothétique a été écarté. Certains clones ne montraient aucune homologie avec les gènes répertoriés dans les banques de données. Ces derniers sont peut-être des cadres de lecture ouverts ou peut-être même des régions non-codantes. Pour cette raison, nous n'avons pas tenté de les étudier. Il est également à noter que plusieurs clones correspondaient à des régions intergéniques et semblaient posséder une séquence

partielle de protéine à chaque extrémité. Plusieurs clones ayant de bonnes homologies avec le génome de *Citrobacter rodentium* possédait cette caractéristique. Tel que mentionné dans la section 2.3, un clone correspondant à une section d'un SSTT hypothétique a été identifié et nous avons tenté de le caractériser.

Le système ETT2 a premièrement été identifié lorsque deux équipes ont terminé le séquençage de deux souches EHEC O157 :H7. La comparaison de ces nouveaux génomes avec celui d'une souche K-12 déjà séquencée révéla la présence de ce système homologue au SSTT retrouvé dans le SPI1 de *Salmonella* (Hayashi *et al.*, 2001; Perna *et al.*, 2001). Le système ne contient que les gènes servant à la formation de l'aiguille hypothétique et ne semble pas contenir de gènes codant pour des protéines effectrices. Il est possible que les protéines hypothétiquement excrétées par ce système soient encodées à un autre endroit sur le génome (Hayashi *et al.*, 2001; Makino *et al.*, 2003). Par la suite, une équipe Japonaise effectua des travaux sur des isolats UPEC chez lesquels ils manquaient la plupart des adhésines connues. Parmi ces isolats, certaines souches possédaient un plus grand pouvoir d'invasion que d'autres (Miyazaki *et al.*, 2002b). Basé sur une approche d'hybridation soustractive entre une souche clinique plus invasive qu'une autre, le système ETT2 a été identifié. Il a été suggéré par cette équipe que le système pouvait être responsable de cette plus grande invasion (Miyazaki *et al.*, 2002a). Cependant, la validité de cette hypothèse n'a pas été testée. De plus, ils ont effectué un criblage par hybridation de type Southern chez 100 UPEC et seulement trois possédaient le système alors que leur test d'invasion démontra un phénotype de forte invasion chez près de 78% des isolats testés (Miyazaki *et al.*, 2002a; Miyazaki *et al.*, 2002b).

Les résultats obtenus par cette équipe sont discutables. Premièrement, les bactéries employées pour les tests d'invasion étaient des bactéries cultivées pendant toute une nuit sans spécification des conditions (i.e. statique ou avec agitation, milieu de culture inconnu) et l'interaction des bactéries avec les cellules était uniquement de 30 minutes suivit d'une incubation de seulement 15 minutes après l'ajout de la gentamicine. Ces conditions sont différentes de celles employées dans la plupart des tests similaires (Elsinghorst, 1994; Martinez *et al.*, 2000). Est-ce que le système est exprimé sous les

conditions de la préculture? Si non, a-t-il vraiment le temps de l'être et de remplir sa fonction en 30 minutes? Est-ce que le temps d'incubation avec la gentamicine de 15 minutes est suffisant pour éliminer les bactéries extracellulaires? Est-ce que tous ces isolats cliniques ont la même susceptibilité à la gentamicine? On ne mentionne aucun aspect de résistance aux antibiotiques dans ces deux articles. Peut-être que ces pourcentages d'invasion ne sont en fait que des différences de résistance à la gentamicine. De plus, les auteurs rapportent n'avoir vu aucune différence dans l'invasion avec l'ajout ou non de mannose alors que d'autres laboratoires ont clairement démontré le rôle du mannose pour inhiber l'invasion médiée par les fimbriae de type 1 (Martinez *et al.*, 2000). Un autre point est qu'ils ne calculent pas le taux d'invasion par rapport à l'inoculum initial mais uniquement par le nombre de bactéries retrouvées par puits après le test soit plus de 500 bactéries pour une souche dite invasive et moins de 10 bactéries pour une souche dite non-invasive (à partir d'un inoculum de 2×10^7). Il est possible que ces isolats cliniques aient une croissance différente dans le milieu de culture cellulaire. Ce manque de rigueur dans la technique peut être suffisant pour remarquer ce qu'il extrapole être une différence d'invasion. Tous ces paramètres permettent de douter du lien fait entre le pouvoir invasif de ces souches cliniques et la présence du système ETT2. Néanmoins, ils ont montré que ce système se retrouve chez trois souches UPEC dont une qui possède un sérotype similaire à celui retrouvé chez les CGA c'est-à-dire O77. L'intégrité du système n'a pas été vérifiée.

Par la suite, la présence du système chez différents isolats cliniques a été évaluée dans le cadre de plusieurs études. Ces dernières ont montré une bonne prévalence du système chez une variété de souches pour la plupart pathogènes intestinales. Par contre, elles ont fait ressortir l'hétérogénéité du système, c'est-à-dire que le système n'est pas complet chez toutes les souches et semble avoir subi plusieurs types de délétions (Hartleib *et al.*, 2003; Makino *et al.*, 2003; Prager *et al.*, 2004). Après ces premiers signes de système incomplet, Ren *et al.* ont scruté la diversité d'*E. coli* par le biais de la collection ECOR et ont jeté les bases d'explications quant à la distribution et la fonctionnalité de ce système (Ren *et al.*, 2004). Celui-ci aurait une taille de pratiquement 30kb et serait présent chez la plupart de souche d'*E. coli* mais avec différentes délétions.

Un criblage PCR du système chez la collection ECOR révéla que : le groupe phylogénétique B2 semble ne pas posséder le système du tout, les groupes A et B1 possèdent le système avec de multiples délétions et le groupe D est celui qui possède le système le plus intact. Sa distribution, le fait qu'il se retrouve autant chez les souches pathogènes que commensales, son contenu en G-C différent ainsi que sa position constante sur le génome, laissent croire à l'acquisition du système tôt dans l'évolution d'*E. coli* plutôt que par transfert horizontal chez les souches pathogènes. Cette acquisition se serait faite après la séparation du groupe phylogénétique B2 et aurait été suivie par différentes délétions chez les autres groupes. De plus, *Ren et al.* soulignent que chez les deux souches O157:H7 plusieurs gènes ont des mutations ponctuelles qui les rendent inactifs. Étant donné que ces gènes sont essentiels au bon fonctionnement du système chez *Salmonella*, il est à prévoir que le système chez ces souches d'*E. coli* est non fonctionnel. La seule souche séquencée qui semble posséder un système complet sans mutation non-fonctionnelle est la souche EAEC O42. Cette dernière est une souche apparentée au groupe D. De plus, *Ren et al.* identifient un îlot se trouvant ailleurs dans le génome et qui semble encoder des homologues de protéines effectrices. Un criblage de cet îlot révéla qu'il est également associé au groupe phylogénétique D.

Le système ETT2 est-il fonctionnel ou joue-t-il un rôle dans la virulence? Jusqu'à maintenant, *Tobe et al.* ont rapporté qu'une copie clonée du ETT2 de la souche O157:H7 Sakai est capable de sécréter la protéine EspB chez une souche K-12 (données non-publiées rapportées dans (*Hayashi et al.*, 2001)). Par contre, depuis cette mention, cet auteur n'a pas avancé de travaux plus poussés montrant un système fonctionnel. De plus, l'explication de *Ren et al.* quant à la non-fonctionnalité du système chez les souches O157:H7 séquencées est très plausible. *Zhang et al.* rapportent que la mutation de deux gènes régulateurs dans le système ETT2 conférerait un changement dans la sécrétion de protéines excrétées par le SSTT LEE ainsi qu'une augmentation de l'adhésion cellulaire (*Zhang et al.*, 2004). Il est donc possible que même si le système est non fonctionnel chez ces souches, certains gènes aient des fonctions reliées à la pathogénicité et qu'ils jouent un rôle dans la virulence.

Devant l'identification de ce système chez une souche CGA et en combinant les faits suivants : ce groupe de souches est capable de causer l'infection urinaire malgré le manque de plusieurs facteurs de virulence classiques et que les UPEC sont maintenant associées à un phénotype d'invasion cellulaire, il devenait très intéressant de poser l'hypothèse que le système ETT2 pourrait être fonctionnel chez les souches CGA et leur permettre de causer l'infection. Nous avons donc criblé 30 souches CGA avec la même technique employée par Ren *et al.* Tous les CGA testées semblaient posséder un système ETT2 intact en terme de taille ainsi que l'îlot de protéines effectrices hypothétiques identifié (Ren *et al.*, 2004). Nous avons débuté le séquençage d'une partie du système chez la souche UCB34 et jusqu'à présent, il ne semble pas y avoir de pseudogènes ou de gènes tronqués. Nous avons par la suite entrepris des tests d'invasion cellulaire avec quatre souches CGA choisies et deux contrôles. Ces tests n'ont pas permis d'observer de phénotype d'invasion associé aux souches CGA. En second lieux, nous avons créé un mutant de trois homologues de gènes impliqués dans la formation de l'aiguille chez *Salmonella*, c'est-à-dire les gènes *eivAEG*. La mutation d'un seul de ces gènes chez *Salmonella* abolit le phénotype d'invasion cellulaire (Galan et Curtiss, 1991; Ginocchio *et al.*, 1992; Sukhan *et al.*, 2001). Une seconde série de tests d'invasion cellulaire à l'aide de ce mutant n'a pas permis d'établir un lien entre sa présence et un potentiel d'invasion supérieur. Ces données semblent indiquer que soit le système est non-fonctionnel, ou encore qu'il est impliqué dans une autre fonction que celle de l'invasion cellulaire. Ce qui est également possible compte tenu des données présentées par Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2004). Pour répondre à cette question, une série d'infection animale avec le modèle bien établi d'IU murin a été effectuée. Quelques petits problèmes techniques ont fait que cette expérience n'a pas donné une réponse précise. Néanmoins, elle favorise l'hypothèse d'un système non-fonctionnel ou non-impliqué dans la virulence avec ce modèle. Il est possible que le modèle animal employé représente une limite en soit par rapport à la situation réelle d'infection chez l'hôte naturel. Pour l'instant, nos données ne nous permettent pas d'établir un phénotype fonctionnel ou associé à la virulence.

4.3 Perspective

Les deux techniques employées ont permis l'identification d'un nombre limité de facteurs de virulence associés au groupe CGA. Un point pertinent en vue de poursuivre la caractérisation de ce groupe serait de répéter ces deux techniques en y apportant quelques améliorations. La technique de SCOTS pourrait être refaite en employant des organes ayant un taux d'infection plus élevé. Mis à part ce point, aucun autre paramètre connu ne semble pouvoir augmenter les chances d'avoir un bon taux de réussite. Par contre, avec l'hybridation soustractive, une stratégie précise pourrait augmenter le taux de clones uniques intéressants. Il s'agirait d'employer comme souche à éliminer une UPEC classique comme ce fut le cas dans l'expérience précédente ou encore une souche K-12, d'en extraire l'ADN génomique et de le mélanger avec une certaine proportion d'un extrait des deux plasmides de la souche UCB34. L'emploi de ce mélange d'ADN réduirait les chances d'obtenir des clones de fragments d'ADN codant pour des fonctions plasmidiques ou provenant des plasmides. De plus, selon l'hypothèse que les clones identifiant les mêmes gènes à plusieurs reprises se retrouvent sur les plasmides, nous éliminerions cette répétition ce qui nous permettrait d'avoir une plus grande diversité de clones. Les nouveaux clones ainsi obtenus seraient des fragments d'ADN chromosomiques et pourraient nous révéler la présence de nouveaux facteurs de virulence potentiellement intéressants. Il est d'ailleurs à noter que le système ETT2 correspond à un fragment de 30kb chez la souche UCB34 qui est absent de la souche CFT073 et que lors de la dernière expérimentation, nous avons obtenu un seul clone de 684pb représentant ce fragment chromosomique. La prédominance de clones plasmidiques a probablement diminué la sensibilité de la détection de fragments chromosomiques uniques à la souche d'intérêt et seul une différence chromosomique énorme en terme de taille a pu être détectée. Il est donc raisonnable de penser identifier plus de fragments uniques de la souche UCB34 en bloquant contre ses plasmides.

En ce qui concerne Iha, quelques expériences supplémentaires pourraient être effectuées. Premièrement pour prouver hors de tout doute que le régulateur Fur lie la région promotrice du gène, nous pourrions élaborer une expérimentation d'interaction de

la protéine purifiée avec la région promotrice d'*iha* cloné. Une des stratégie possible serait dans un premier temps de cloner, d'exprimer et de purifier la protéine Fur et de cloner la région promotrice du gène *iha*. Ensuite, nous pourrions biotiner une extraction plasmidique du clone de la région promotrice d'*iha* et la faire interagir avec la protéine Fur purifiée. L'interaction pourrait être visualisé par capture à l'aide de billes couplées à la streptavidine suivie de lavages et de l'observation de l'extrait sur gel SDS-Page. Si on pouvait observer une bande correspondant à la protéine Fur dans cet extrait, en comparaison avec celui effectué avec une extraction plasmidique sans insert, on pourrait affirmer que la protéine Fur lie la région promotrice de *iha*. Cette mise en évidence pourrait être accentué par l'utilisation du gel à retardement. Une seconde expérience qui pourrait être intéressante, serait d'identifier la région où le domaine protéique qui permet à Iha d'agir comme adhésine. Un premier pas dans cette direction serait de comparer sa séquence avec celle de FepA et d'autres récepteurs de sidérophore et d'identifier une région absente de ceux-ci mais présente chez Iha. Par la suite à l'aide de mutagenèse dirigée, nous pourrions interchanger ces régions entre *iha* et un autre récepteur. Par exemple, *fepA* auquel on aurait enlevé une section et qui serait remplacée par celle identifiée chez *iha*, ou encore *iha* auquel on aurait enlevé cette section pour la remplacer par celle de *fepA*. L'acquisition d'un phénotype d'adhésion chez FepA modifié ou la perte du phénotype chez Iha modifié nous indiquerait que cette région de Iha est responsable de l'adhésion. Tel que stipulé dans la section 3.2.5 de l'article, Iha possède peut-être une plus grande affinité pour d'autres sidérophores de type catecholates connus ou inconnus. Il serait pertinent de tester si Iha est capable d'interagir avec d'autres sidérophores de type catecholate comme Vibriobactine ou encore des Salmochelines purifiées.

Il y a également plusieurs expérimentations qui seraient intéressantes à réaliser dans le but d'éclaircir le rôle potentiel du SSTT ETT2. Premièrement, poursuivre le séquençage pour s'assurer que le système ne possède pas de gènes tronqués. Deuxièmement, répéter l'infection animale pour avoir un phénotype clair d'atténuation ou de statu quo quant à la virulence. Troisièmement, tenter d'élucider l'énigme à savoir si le système est fonctionnel ou non. Pour arriver à cette fin, plusieurs possibilités s'offrent à nous. On peut regarder si on détecte l'expression de gènes du système sous différentes

conditions de culture et ce, y compris *in vivo* dans le rein de souris, par PCR en temps réel. Une autre stratégie serait d'effectuer des gels de protéines 2D de la souche sauvage et de la souche mutante et tenter d'identifier des protéines absentes dans le profil de la souche mutante. Il est à noter que le contraire, c'est-à-dire l'apparition de protéines ou l'augmentation de l'expression de certaines protéines chez la souche mutante peut avoir lieu en accord avec les données présentées par Zhang *et al.* (Zhang *et al.*, 2004). Par la suite, ces protéines pourraient être identifiées par spectrométrie de masse. Encore une fois, différentes conditions de culture pourraient être employées. Chez *Salmonella*, il est connu que l'augmentation de la concentration de sel à 0.3M dans le bouillon de culture augmente l'expression du SSTT (Sukhan *et al.*, 2001). La détection de protéines ou d'ARNm correspondant au système ETT2 serait fort intéressante en vue de prouver que le système est fonctionnel. Par contre, l'obtention d'un résultat négatif dans quelques unes de ces expérimentations supplémentaires fermerait la porte à toute fonctionnalité du système chez les CGA.

Conclusion

Le groupe CGA est un groupe d'*Echerichia coli* uropathogène non-caractérisé. L'étude d'un membre représentant de ce groupe a permis l'identification de deux facteurs de virulence potentiels présents chez ces souches. Le premier, Iha, est un facteur qui semble conférer à la fois un phénotype d'adhésion cellulaire et un phénotype de récepteur de sidérophore. Son rôle pour l'infection dans le modèle murin a été confirmé, le classant ainsi comme facteur de virulence chez les souches CGA. Le deuxième facteur est un système de sécrétion de type trois qui, selon les premières investigations, ne semble pas contribuer à la virulence dans le modèle murin et ne semble pas conférer un phénotype d'invasion cellulaire. L'étude plus poussée de ce système, quoiqu'un peu incertaine, pourrait permettre d'expliquer l'habileté des CGA à causer l'infection malgré le manque de plusieurs facteurs de virulence classiques. Enfin, l'identification d'autres facteurs de virulence potentiels chez ce groupe de souches en améliorant la méthodologie employée représente une avenue de recherche très prometteuse.

Références

- Amor, K., D. E. Heinrichs, E. Fridrich, K. Ziebell, R. P. Johnson et C. Whitfield. 2000. "Distribution of core oligosaccharide types in lipopolysaccharides from *Escherichia coli*". Infect Immun. vol. 68, no. 3, p. 1116-24.
- Anderson, G. G., J. J. Palermo, J. D. Schilling, R. Roth, J. Heuser et S. J. Hultgren. 2003. "Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections". Science. vol. 301, no. 5629, p. 105-7.
- Anderson, G. G., K. W. Dodson, T. M. Hooton et S. J. Hultgren. 2004. "Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis". Trends Microbiol. vol. 12, no. 9, p. 424-30.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson et F. Rodriguez-Quinones. 2003. "Bacterial iron homeostasis". FEMS Microbiol Rev. vol. 27, no. 2-3, p. 215-37.
- American Type Culture Collection. "ATCC The global Biosource Center". <<http://www.atcc.org/Home.cfm>>. 2005.
- Bahrani-Mougeot F.K., E.L. Buckles, C.V. Lockett, J.R. Hebel, D.E. Johnson, C.M. Tang et M.S. Donnenberg. 2002. "Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinant in the murine urinary tract". Mol Microbiol. vol. 45, no. 4, p.1079-93.
- Ball, K. D. et J. T. Trevors. 2002. "Bacterial genomics: the use of DNA microarrays and bacterial artificial chromosomes". J Microbiol Methods. vol. 49, no. 3, p. 275-84.
- Baltes, N. et G. F. Gerlach. 2004. "Identification of genes transcribed by *Actinobacillus pleuropneumoniae* in necrotic porcine lung tissue by using selective capture of transcribed sequences". Infect Immun. vol. 72, no. 11, p. 6711-6.
- Bauer, R. J., L. Zhang, B. Foxman, A. Siitonen, M. E. Jantunen, H. Saxen et C. F. Marrs. 2002. "Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iroN_{E. coli}*". J Infect Dis. vol. 185, no. 10, p. 1521-4.
- Blattner F.R. "*E. coli* Genome Project University of Wisconsin- Madison". <<http://www.genome.wisc.edu/sequencing/rs218.htm>>. 2004.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau et Y. Shao. 1997. "The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12". Science. vol. 277, no. 5331, p. 1453-74.
- Boquet, P. 2001. "The cytotoxic necrotizing factor 1 (CNF1) from *Escherichia coli*". Toxicon. vol. 39, no. 11, p. 1673-80.

Bower, J. M., D. S. Eto et M. A. Mulvey. 2005. "Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract". Traffic. vol. 6, no. 1, p. 18-31.

Boyd, E. F., K. Nelson, F. S. Wang, T. S. Whittam et R. K. Selander. 1994. "Molecular genetic basis of allelic polymorphism in malate dehydrogenase (*mdh*) in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 91, no. 4, p. 1280-4.

Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros et M. F. Cellier. 2002. "Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*". Infect Immun. vol. 70, no. 11, p. 6032-42.

Braun, V. et M. Braun. 2002. "Iron transport and signaling in *Escherichia coli*". FEBS Lett. vol. 529, no. 1, p. 78-85.

Braun, V., S. I. Patzer et K. Hantke. 2002. "Ton-dependent colicins and microcins: modular design and evolution". Biochimie. vol. 84, no. 5-6, p. 365-80.

Brickman, T. J. et M. A. McIntosh. 1992. "Overexpression and purification of ferric enterobactin esterase from *Escherichia coli*. Demonstration of enzymatic hydrolysis of enterobactin and its iron complex". J Biol Chem. vol. 267, no. 17, p. 12350-5.

Buchanan, S. K., B. S. Smith, L. Venkatramani, D. Xia, L. Esser, M. Palnitkar, R. Chakraborty, D. van der Helm et J. Deisenhofer. 1999. "Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*". Nat Struct Biol. vol. 6, no. 1, p. 56-63.

Buckles, E.L., F.K. Bahrani-Mougeot, A. Molina, C.V. Lockatell, D.E. Johnson, C.B. Drachenberg, V. Burland, F.R. Blattner et M.S. Donnenberg. 2004. "Identification and characterisation of a novel uropathogenic *Escherichia coli*-associated fimbrial gene cluster". Infect Immun. vol. 72, no. 7, p. 3890-901.

Bullen, J. J., H. J. Rogers, P. B. Spalding et C. G. Ward. 2005. "Iron and infection: the heart of the matter". FEMS Immunol Med Microbiol. vol. 43, no. 3, p. 325-30.

Burns, S. M. et S. I. Hull. 1999. "Loss of resistance to ingestion and phagocytic killing by O (-) and K(-) mutants of a uropathogenic *Escherichia coli* O75:K5 strain". Infect Immun. vol. 67, no. 8, p. 3757-62.

Cao, Z. et P. E. Klebba. 2002. "Mechanisms of colicin binding and transport through outer membrane porins". Biochimie. vol. 84, no. 5-6, p. 399-412.

Caugant, D. A., B. R. Levin, I. Orskov, F. Orskov, C. Svanborg Eden et R. K. Selander. 1985. "Genetic diversity in relation to serotype in *Escherichia coli*". Infect Immun. vol. 49, no. 2, p. 407-13.

- Chaudhuri, R. R., A. M. Khan et M. J. Pallen. 2004. "coliBASE: an online database for *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* comparative genomics". Nucleic Acids Res. vol. 32, no. Database issue, p. D296-9.
- Cherepanov, P. P. et W. Wackernagel. 1995. "Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of FIp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant". Gene. vol. 158, no. 1, p. 9-14.
- Chiang, S. L., J. J. Mekalanos et D. W. Holden. 1999. "*In vivo* genetic analysis of bacterial virulence". Annu Rev Microbiol. vol. 53, no. p. 129-54.
- Clarke, S. C., R. D. Haigh, P. P. Freestone et P. H. Williams. 2003. "Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen". Clin Microbiol Rev. vol. 16, no. 3, p. 365-78.
- Clermont, O., S. Bonacorsi et E. Bingen. 2000. "Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group". Appl Environ Microbiol. vol. 66, no. 10, p. 4555-8.
- Clontech Laboratories inc. 2001. "Clontech PCR-Select bacterial genome subtraction kit user manual: PT3170-1". Palo Alto CA.
- Connell, I., W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Marild et C. Svanborg. 1996. "Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 93, no. 18, p. 9827-32.
- Conway, T. et G. K. Schoolnik. 2003. "Microarray expression profiling: capturing a genome-wide portrait of the transcriptome". Mol Microbiol. vol. 47, no. 4, p. 879-89.
- Crichton, R. R., S. Wilmet, R. Legssyer et R. J. Ward. 2002. "Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells". J Inorg Biochem. vol. 91, no. 1, p. 9-18.
- Crosa, J. H. et C. T. Walsh. 2002. "Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria". Microbiol Mol Biol Rev. vol. 66, no. 2, p. 223-49.
- Daigle, F., J. Y. Hou et J. E. Clark-Curtiss. 2002. "Microbial gene expression elucidated by selective capture of transcribed sequences (SCOTS)". Methods Enzymol. vol. 358, no. p. 108-22.
- Datsenko, K. A. et B. L. Wanner. 2000. "One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 97, no. 12, p. 6640-5.
- Demir, M. et I. Kaleli. 2004. "Production by *Escherichia coli* isolates of siderophore and other virulence factors and their pathogenic role in a cutaneous infection model". Clin Microbiol Infect. vol. 10, no. 11, p. 1011-4.

Desvaux, M., N. J. Parham et I. R. Henderson. 2004. "The autotransporter secretion system". Res Microbiol. vol. 155, no. 2, p. 53-60.

Dharmadi, Y. et R. Gonzalez. 2004. "DNA microarrays: experimental issues, data analysis, and application to bacterial systems". Biotechnol Prog. vol. 20, no. 5, p. 1309-24.

Dobrindt, U., F. Agerer, K. Michaelis, A. Janka, C. Buchrieser, M. Samuelson, C. Svanborg, G. Gottschalk, H. Karch et J. Hacker. 2003. "Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays". J Bacteriol. vol. 185, no. 6, p. 1831-40.

Dougan, G., A. Haque, D. Pickard, G. Frankel, P. O'Goara et J. Wain. 2001. "The *Escherichia coli* gene pool". Curr Opin Microbiol. vol. 4, no. 1, p. 90-4.

Dozois, C. M. et R. Curtiss, 3rd. 1999. "Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream". Vet Res. vol. 30, no. 2-3, p. 157-79.

Dozois, C. M., F. Daigle et R. Curtiss, 3rd. 2003. "Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed *in vivo* by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 100, no. 1, p. 247-52.

Elsinghorst, E. A. 1994. "Measurement of invasion by gentamicin resistance". Methods Enzymol. vol. 236, no. p. 405-20.

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

Escolar, L., J. Perez-Martin et V. de Lorenzo. 1999. "Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein". J Bacteriol. vol. 181, no. 20, p. 6223-9.

Falkow, S. 2004. "Molecular Koch's postulates applied to bacterial pathogenicity--a personal recollection 15 years later". Nat Rev Microbiol. vol. 2, no. 1, p. 67-72.

Faraldo-Gomez, J. D. et M. S. Sansom. 2003. "Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria". Nat Rev Mol Cell Biol. vol. 4, no. 2, p. 105-16.

Farthing, M. J. 2004. "Bugs and the gut: an unstable marriage". Best Pract Res Clin Gastroenterol. vol. 18, no. 2, p. 233-9.

Finer, G. et D. Landau. 2004. "Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy". Lancet Infect Dis. vol. 4, no. 10, p. 631-5.

Fitzgerald, J. R. et J. M. Musser. 2001. "Evolutionary genomics of pathogenic bacteria". Trends Microbiol. vol. 9, no. 11, p. 547-53.

Foxman, B., R. Barlow, H. D'Arcy, B. Gillespie et J. D. Sobel. 2000. "Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs". Ann Epidemiol. vol. 10, no. 8, p. 509-15.

Foxman, B. et L. Riley. 2001. "Molecular epidemiology: focus on infection". Am J Epidemiol. vol. 153, no. 12, p. 1135-41.

Foxman, B. 2002. "Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs". Am J Med. vol. 113 Suppl 1A, no. p. 5S-13S.

France, A. M., K. M. Kugeler, A. Freeman, C. A. Zalewski, M. Blahna, L. Zhang, C. F. Marrs et B. Foxman. 2005. "Clonal groups and the spread of resistance to trimethoprim-sulfamethoxazole in uropathogenic *Escherichia coli*". Clin Infect Dis. vol. 40, no. 8, p. 1101-7.

Frosch, M., J. Reidl et U. Vogel. 1998. "Genomics in infectious diseases: approaching the pathogens". Trends Microbiol. vol. 6, no. 9, p. 346-9.

Fukiya, S., H. Mizoguchi, T. Tobe et H. Mori. 2004. "Extensive genomic diversity in pathogenic *Escherichia coli* and *Shigella* Strains revealed by comparative genomic hybridization microarray". J Bacteriol. vol. 186, no. 12, p. 3911-21.

Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard et M. A. McIntosh. 2002. "Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter". Mol Microbiol. vol. 44, no. 5, p. 1225-34.

Galan, J. E. et R. Curtiss, 3rd. 1991. "Distribution of the *invA*, -B, -C, and -D genes of *Salmonella typhimurium* among other *Salmonella* serovars: *invA* mutants of *Salmonella typhi* are deficient for entry into mammalian cells". Infect Immun. vol. 59, no. 9, p. 2901-8.

Galan, J. E. et A. Collmer. 1999. "Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells". Science. vol. 284, no. 5418, p. 1322-8.

Ginocchio, C., J. Pace et J. E. Galan. 1992. "Identification and molecular characterization of a *Salmonella typhimurium* gene involved in triggering the internalization of salmonellae into cultured epithelial cells". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 89, no. 13, p. 5976-80.

Goldsby R.A., T. J. Kindt et B. A. Osborne. 2001. Immunologie Le cours de Janis Kuby. Traduction de S. Weinman. Dunod. Paris. 660 pages.

Gordon, D. M., S. E. Stern et P. J. Collignon. 2005. "Influence of the age and sex of human hosts on the distribution of *Escherichia coli* ECOR groups and virulence traits". Microbiology. vol. 151, Pt 1, p. 15-23.

Graham, J. E. et J. E. Clark-Curtiss. 1999. "Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective

capture of transcribed sequences (SCOTS)". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 96, no. 20, p. 11554-9.

Gupta, K. et W.E. Stamm. 2005. Infectious diseases. XXIII Urinary tract infections. <<http://www.acpmedicine.com/sample/ch0723s.htm>> Éditeur D.C. Dale. ACP Medicine A Publication of the American college of physicians. Washington.

Guyer, D. M., J. S. Kao et H. L. Mobley. 1998. "Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, and Catheter-associated bacteriuria and from fecal samples". Infect Immun. vol. 66, no. 9, p. 4411-7.

Guyer, D. M., I. R. Henderson, J. P. Nataro et H. L. Mobley. 2000. "Identification of *sat*, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*". Mol Microbiol. vol. 38, no. 1, p. 53-66.

Guyer, D. M., S. Radulovic, F. E. Jones et H. L. Mobley. 2002. "Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells". Infect Immun. vol. 70, no. 8, p. 4539-46.

Hacker, J., H. Bruggemann et G. Gottschalk. Göttingen Genomic Laboratory. "Projects: *Escherichia coli* 536". <http://www.g21.bio.uni-goettingen.de/projects/c_proj_ec.html>. 2004.

Hacker, J., C. Hughes, H. Hof et W. Goebel. 1983. "Cloned hemolysin genes from *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice". Infect Immun. vol. 42, no. 1, p. 57-63.

Handfield, M. et R. C. Levesque. 1999. "Strategies for isolation of *in vivo* expressed genes from bacteria". FEMS Microbiol Rev. vol. 23, no. 1, p. 69-91.

Handfield, M., L. J. Brady, A. Progulsk-Fox et J. D. Hillman. 2000. "IVIAT: a novel method to identify microbial genes expressed specifically during human infections". Trends Microbiol. vol. 8, no. 7, p. 336-9.

Hang, L., M. John, M. Asaduzzaman, E. A. Bridges, C. Vanderspurt, T. J. Kirn, R. K. Taylor, J. D. Hillman, A. Progulsk-Fox, M. Handfield, E. T. Ryan et S. B. Calderwood. 2003. "Use of *in vivo*-induced antigen technology (IVIAT) to identify genes uniquely expressed during human infection with *Vibrio cholerae*". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 100, no. 14, p. 8508-13.

Hansen-Wester, I. et M. Hensel. 2001. "*Salmonella* pathogenicity islands encoding type III secretion systems". Microbes Infect. vol. 3, no. 7, p. 549-59.

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

Hantke, K., G. Nicholson, W. Rabsch et G. Winkelmann. 2003. "Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IronN". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 100, no. 7, p. 3677-82.

Hantke, K. 2004. Iron Transport in Bacteria. Ferrous iron transport. Éditeur J.H. Crosa, A.R. Mey et S.M. Payne. Washington D.C. ASM Press. p178-184.

Harel J. et C. Martin. 1999. "Virulence gene regulation in pathogenic *Escherichia coli*". Vet. Res. vol. 30, no. 2-3, P. 131-155.

Hartleib, S., R. Prager, I. Hedenstrom, S. Lofdahl et H. Tschape. 2003. "Prevalence of the new, SPI1-like, pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli*". Int J Med Microbiol. vol. 292, no. 7-8, p. 487-93.

Hayashi, T., K. Makino, M. Ohnishi, K. Kurokawa, K. Ishii, K. Yokoyama, C. G. Han, E. Ohtsubo, K. Nakayama, T. Murata, M. Tanaka, T. Tobe, T. Iida, H. Takami, T. Honda, C. Sasakawa, N. Ogasawara, T. Yasunaga, S. Kuhara, T. Shiba, M. Hattori et H. Shinagawa. 2001. "Complete genome sequence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and genomic comparison with a laboratory strain K-12". DNA Res. vol. 8, no. 1, p. 11-22.

Heimer, S. R., D. A. Rasko, C. V. Lockatell, D. E. Johnson et H. L. Mobley. 2004. "Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection". Infect Immun. vol. 72, no. 1, p. 593-7.

Heinrichs, D. E., J. A. Yethon et C. Whitfield. 1998. "Molecular basis for structural diversity in the core regions of the lipopolysaccharides of *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*". Mol Microbiol. vol. 30, no. 2, p. 221-32.

Heithoff, D. M., C. P. Conner, P. C. Hanna, S. M. Julio, U. Hentschel et M. J. Mahan. 1997. "Bacterial infection as assessed by *in vivo* gene expression". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 94, no. 3, p. 934-9.

Henderson, I. R. et J. P. Nataro. 2001. "Virulence functions of autotransporter proteins". Infect Immun. vol. 69, no. 3, p. 1231-43.

Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia, M. Desvaux, R. C. Fernandez et D. Ala'Aldeen. 2004. "Type V protein secretion pathway: the autotransporter story". Microbiol Mol Biol Rev. vol. 68, no. 4, p. 692-744.

Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye et T. S. Whittam. 1990. "Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*". J Bacteriol. vol. 172, no. 11, p. 6175-81.

Hinton, J. C., I. Hautefort, S. Eriksson, A. Thompson et M. Rhen. 2004. "Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection". Curr Opin Microbiol. vol. 7, no. 3, p. 277-82.

Holden, N. J. et D. L. Gally. 2004. "Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence". J Med Microbiol. vol. 53, no. Pt 7, p. 585-93.

Holmes R. K. et M. G. Jobling. 1996. Medical Microbiology. Section 1. Bacteriology. chap. 5 Genetics. Éditeur S. Baron. <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed>>. Galveston. The University of Texas medical branch at Galveston

Hooton, T.M. et W.E. Stamm 1996. Urinary tract infections, molecular pathogenesis and clinical management, The vaginal flora and urinary tract infections. Éditeur H. L. T. Mobley et J. W. Warren. ASM Press. Washington D.C. p. 67-94.

Horwitz, M. A. et S. C. Silverstein. 1980. "Influence of the *Escherichia coli* capsule on complement fixation and on phagocytosis and killing by human phagocytes". J Clin Invest. vol. 65, no. 1, p. 82-94.

Hueck, C. J. 1998. "Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants". Microbiol Mol Biol Rev. vol. 62, no. 2, p. 379-433.

Jain, R., M. C. Rivera, J. E. Moore et J. A. Lake. 2002. "Horizontal gene transfer in microbial genome evolution". Theor Popul Biol. vol. 61, no. 4, p. 489-95.

John, M., I. T. Kudva, R. W. Griffin, A. W. Dodson, B. McManus, B. Krastins, D. Sarracino, A. Progulsk-Fox, J. D. Hillman, M. Handfield, P. I. Tarr et S. B. Calderwood. 2005. "Use of *in vivo*-induced antigen technology for identification of *Escherichia coli* O157:H7 proteins expressed during human infection". Infect Immun. vol. 73, no. 5, p. 2665-79.

Johnson, D. E., C. Drachenberg, C. V. Lockatell, M. D. Island, J. W. Warren et M. S. Sonnenberg. 2000a. "The role of cytotoxic necrotizing factor-1 in colonization and tissue injury in a murine model of urinary tract infection". FEMS Immunol Med Microbiol. vol. 28, no. 1, p. 37-41.

Johnson, J. R. 1991. "Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection". Clin Microbiol Rev. vol. 4, no. 1, p. 80-128.

Johnson, J. R., P. Goulet, B. Picard, S. L. Moseley, P. L. Roberts et W. E. Stamm. 1991. "Association of carboxylesterase B electrophoretic pattern with presence and expression of urovirulence factor determinants and antimicrobial resistance among strains of *Escherichia coli* that cause urosepsis". Infect Immun. vol. 59, no. 7, p. 2311-5.

Johnson, J. R., T. A. Russo, P. I. Tarr, U. Carlino, S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr. et A. L. Stell. 2000b. "Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN_{E. coli}*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis". Infect Immun. vol. 68, no. 5, p. 3040-7.

- Johnson, J. R., P. Delavari, M. Kuskowski et A. L. Stell. 2001. "Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*". J Infect Dis. vol. 183, no. 1, p. 78-88.
- Johnson, J. R., A. R. Manges, T. T. O'Bryan et L. W. Riley. 2002. "A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis". Lancet. vol. 359, no. 9325, p. 2249-51.
- Johnson, J. R., H. A. Lockman, K. Owens, S. Jelacic et P. I. Tarr. 2003. "High-frequency secondary mutations after suicide-driven allelic exchange mutagenesis in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*". J Bacteriol. vol. 185, no. 17, p. 5301-5.
- Johnson, J. R. 2003. "Microbial virulence determinants and the pathogenesis of urinary tract infection". Infect Dis Clin North Am. vol. 17, no. 2, p. 261-78, viii.
- Johnson, J. R., K. Owens, A. R. Manges et L. W. Riley. 2004. "Rapid and specific detection of *Escherichia coli* clonal group A by gene-specific PCR". J Clin Microbiol. vol. 42, no. 6, p. 2618-22.
- Johnson, J. R., S. Jelacic, L. M. Schoening, C. Clabots, N. Shaikh, H. L. Mobley et P. I. Tarr. 2005a. "The IrgA homologue adhesin Iha is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection". Infect Immun. vol. 73, no. 2, p. 965-71.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, A. Gajewski, S. Soto, J. P. Horcajada, M. T. Jimenez de Anta et J. Vila. 2005b. "Extended virulence genotypes and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis". J Infect Dis. vol. 191, no. 1, p. 46-50.
- Johnson, J. R., A. C. Murray, M. A. Kuskowski, S. Schubert, M. F. Prere, B. Picard, R. Colodner et R. Raz. 2005c. "Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A". Emerg Infect Dis. vol. 11, no. 1, p. 141-5.
- Kammler, M., C. Schon et K. Hantke. 1993. "Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*". J Bacteriol. vol. 175, no. 19, p. 6212-9.
- Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Schlauch et M. E. Maguire. 2002. "SitABCD is the alkaline Mn²⁺ transporter of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*". J Bacteriol. vol. 184, no. 12, p. 3159-66.
- Lawrence, J. G. et H. Ochman. 1998. "Molecular archaeology of the *Escherichia coli* genome". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 95, no. 16, p. 9413-7.
- Litwin, C. M. et S. B. Calderwood. 1993. "Role of iron in regulation of virulence genes". Clin Microbiol Rev. vol. 6, no. 2, p. 137-49.
- Loewen, P. C., B. Hu, J. Strutinsky et R. Sparling. 1998. "Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*". Can J Microbiol. vol. 44, no. 8, p. 707-17.

Lorenzo de V., J. Perez-Martin, L. Escolar, G. Pesole et G. Bertoni 2004. Iron Transport in Bacteria. Mode of binding of the Fur protein to target DNA : negative regulation of iron-controlled gene expression. Éditeur J.H. Crosa, A.R. Mey et S.M. Payne. Washington D.C. ASM Press. p185-96.

Loströh, C. P. et C. A. Lee. 2001. "The *Salmonella* pathogenicity island-1 type III secretion system". Microbes Infect. vol. 3, no. 14-15, p. 1281-91.

Lundrigan, M. D. et R. J. Kadner. 1986. "Nucleotide sequence of the gene for the ferrienterochelin receptor FepA in *Escherichia coli*. Homology among outer membrane receptors that interact with TonB". J Biol Chem. vol. 261, no. 23, p. 10797-801.

Magnusson, L. U., A. Farewell et T. Nystrom. 2005. "ppGpp: a global regulator in *Escherichia coli*". Trends Microbiol. vol. 13, no. 5, p. 236-42.

Makino, S., T. Tobe, H. Asakura, M. Watarai, T. Ikeda, K. Takeshi et C. Sasakawa. 2003. "Distribution of the secondary type III secretion system locus found in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 isolates among Shiga toxin-producing *E. coli* strains". J Clin Microbiol. vol. 41, no. 6, p. 2341-7.

Manges, A. R., J. R. Johnson, B. Foxman, T. T. O'Bryan, K. E. Fullerton et L. W. Riley. 2001. "Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group". N Engl J Med. vol. 345, no. 14, p. 1007-13.

Manges, A. R., P. S. Dietrich et L. W. Riley. 2004. "Multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal groups causing community-acquired pyelonephritis". Clin Infect Dis. vol. 38, no. 3, p. 329-34.

Marre, R., J. Hacker, W. Henkel et W. Goebel. 1986. "Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model". Infect Immun. vol. 54, no. 3, p. 761-7.

Martinez, J. J., M. A. Mulvey, J. D. Schilling, J. S. Pinkner et S. J. Hultgren. 2000. "Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells". Embo J. vol. 19, no. 12, p. 2803-12.

Maslow, J. N., T. S. Whittam, C. F. Gilks, R. A. Wilson, M. E. Mulligan, K. S. Adams et R. D. Arbeit. 1995. "Clonal relationships among bloodstream isolates of *Escherichia coli*". Infect Immun. vol. 63, no. 7, p. 2409-17.

McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper et S. C. Andrews. 2003. "Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis". J Biol Chem. vol. 278, no. 32, p. 29478-86.

Middendorf, B., B. Hochhut, K. Leipold, U. Dobrindt, G. Blum-Oehler et J. Hacker. 2004. "Instability of pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* 536". J Bacteriol. vol. 186, no. 10, p. 3086-96.

- Miyazaki, J., W. Ba-Thein, T. Kumao, H. Akaza et H. Hayashi. 2002a. "Identification of a type III secretion system in uropathogenic *Escherichia coli*". FEMS Microbiol Lett. vol. 212, no. 2, p. 221-8.
- Miyazaki, J., W. Ba-Thein, T. Kumao, M. Obata Yasuoka, H. Akaza et H. Hayshi. 2002b. "Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells". FEMS Immunol Med Microbiol. vol. 33, no. 1, p. 23-6.
- Morrow, B. J., J. E. Graham et R. Curtiss, 3rd. 1999. "Genomic subtractive hybridization and selective capture of transcribed sequences identify a novel *Salmonella typhimurium* fimbrial operon and putative transcriptional regulator that are absent from the *Salmonella typhi* genome". Infect Immun. vol. 67, no. 10, p. 5106-16.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling, J. J. Martinez et S. J. Hultgren. 2000. "Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 97, no. 16, p. 8829-35.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling et S. J. Hultgren. 2001. "Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection". Infect Immun. vol. 69, no. 7, p. 4572-9.
- Mulvey, M. A. 2002. "Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*". Cell Microbiol. vol. 4, no. 5, p. 257-71.
- Murphy, K. C. 1998. "Use of bacteriophage lambda recombination functions to promote gene replacement in *Escherichia coli*". J Bacteriol. vol. 180, no. 8, p. 2063-71.
- Murphy, K. C. et K. G. Campellone. 2003. "Lambda Red-mediated recombinogenic engineering of enterohemorrhagic and enteropathogenic *E. coli*". BMC Mol Biol. vol. 4, no. 1, p. 11.
- Nagy, G., U. Dobrindt, M. Kupfer, L. Emody, H. Karch et J. Hacker. 2001. "Expression of hemin receptor molecule ChuA is influenced by RfaH in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536". Infect Immun. vol. 69, no. 3, p. 1924-8.
- Nataro, J. P. et J. B. Kaper. 1998. "Diarrheagenic *Escherichia coli*". Clin Microbiol Rev. vol. 11, no. 1, p. 142-201.
- National Center for Biotechnology Information. " NCBI Homepage" <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. 2005.
- Nelson, K., T. S. Whittam et R. K. Selander. 1991. "Nucleotide polymorphism and evolution in the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene (*gapA*) in natural populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 88, no. 15, p. 6667-71.

Nelson, K. et R. K. Selander. 1992. "Evolutionary genetics of the proline permease gene (*putP*) and the control region of the proline utilization operon in populations of *Salmonella* and *Escherichia coli*". J Bacteriol. vol. 174, no. 21, p. 6886-95.

Nicolle, L. E. 2002. "Urinary tract infection: traditional pharmacologic therapies". Am J Med. vol. 113 Suppl 1A, p. 35S-44S.

Nikaido, H. et E. Y. Rosenberg. 1990. "Cir and Fiu proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: study with beta-lactam antibiotics containing catechol and analogous groups". J Bacteriol. vol. 172, no. 3, p. 1361-7.

O'Brien, I. G. et F. Gibson. 1970. "The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*". Biochim Biophys Acta. vol. 215, no. 2, p. 393-402.

Ochman, H. et R. K. Selander. 1984a. "Evidence for clonal population structure in *Escherichia coli*". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 81, no. 1, p. 198-201.

Ochman, H. et R. K. Selander. 1984b. "Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations". J Bacteriol. vol. 157, no. 2, p. 690-3.

Ochman, H., J. G. Lawrence et E. A. Groisman. 2000. "Lateral gene transfer and the nature of bacterial innovation". Nature. vol. 405, no. 6784, p. 299-304.

Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt et J. Hacker. 2002a. "Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence". Int J Antimicrob Agents. vol. 19, no. 6, p. 517-21.

Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt et J. Hacker. 2002b. "Virulence factors of uropathogens". Curr Opin Urol. vol. 12, no. 1, p. 33-8.

Parham, N. J., U. Srinivasan, M. Desvaux, B. Foxman, C. F. Marrs et I. R. Henderson. 2004. "PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*". FEMS Microbiol Lett. vol. 230, no. 1, p. 73-83.

Parreira, V. R. et C. L. Gyles. 2003. "A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin". Infect Immun. vol. 71, no. 9, p. 5087-96.

Payne, S. et A.R. Mey. 2004. Iron Transport in Bacteria. Pathogenic *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*. Éditeur J.H. Crosa, A.R. Mey et S.M. Payne. Washington D.C. ASM Press. p. 199-218.

Perkins-Balding D., A. Rasmussen et I. Stojiljkovic. 2004. Iron Transport in Bacteria. Bacterial Heme and Hemoprotein receptors. Éditeur J.H. Crosa, A.R. Mey et S.M. Payne. Washington D.C. ASM Press. p. 66-85.

- Perna, N. T., G. Plunkett, 3rd, V. Burland, B. Mau, J. D. Glasner, D. J. Rose, G. F. Mayhew, P. S. Evans, J. Gregor, H. A. Kirkpatrick, G. Posfai, J. Hackett, S. Klink, A. Boutin, Y. Shao, L. Miller, E. J. Grotbeck, N. W. Davis, A. Lim, E. T. Dimalanta, K. D. Potamousis, J. Apodaca, T. S. Anantharaman, J. Lin, G. Yen, D. C. Schwartz, R. A. Welch et F. R. Blattner. 2001. "Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7". Nature. vol. 409, no. 6819, p. 529-33.
- Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion et E. Denamur. 1999. "The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection". Infect Immun. vol. 67, no. 2, p. 546-53.
- Pollack, J. R. et J. B. Neilands. 1970. "Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*". Biochem Biophys Res Commun. vol. 38, no. 5, p. 989-92.
- Posfai, G., M. D. Koob, H. A. Kirkpatrick et F. R. Blattner. 1997. "Versatile insertion plasmids for targeted genome manipulations in bacteria: isolation, deletion, and rescue of the pathogenicity island LEE of the *Escherichia coli* O157:H7 genome". J Bacteriol. vol. 179, no. 13, p. 4426-8.
- Prager, R., R. Bauerfeind, E. Tietze, J. Behrend, A. Fruth et H. Tschape. 2004. "Prevalence and deletion types of the pathogenicity island ETT2 among *Escherichia coli* strains from oedema disease and colibacillosis in pigs". Vet Microbiol. vol. 99, no. 3-4, p. 287-94.
- Pramoonjago, P., M. Kaneko, T. Kinoshita, E. Ohtsubo, J. Takeda, K. S. Hong, R. Inagi et K. Inoue. 1992. "Role of TraT protein, an anticomplementary protein produced in *Escherichia coli* by R100 factor, in serum resistance". J Immunol. vol. 148, no. 3, p. 827-36.
- Prats, G., F. Navarro, B. Mirelis, D. Dalmau, N. Margall, P. Coll, A. Stell et J. R. Johnson. 2000. "*Escherichia coli* serotype O15:K52:H1 as a uropathogenic clone". J Clin Microbiol. vol. 38, no. 1, p. 201-9.
- Ramchandani, M., A. R. Manges, C. DebRoy, S. P. Smith, J. R. Johnson et L. W. Riley. 2005. "Possible animal origin of human-associated, multidrug-resistant, uropathogenic *Escherichia coli*". Clin Infect Dis. vol. 40, no. 2, p. 251-7.
- Rasko, D. A., J. A. Phillips, X. Li et H. L. Mobley. 2001. "Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations". J Infect Dis. vol. 184, no. 8, p. 1041-9.
- Ratiner, Y. A., S. Salmenlinna, M. Eklund, M. Keskimaki et A. Siitonen. 2003. "Serology and genetics of the flagellar antigen of *Escherichia coli* O157:H7a,7c". J Clin Microbiol. vol. 41, no. 3, p. 1033-40.
- Ratledge, C. et L. G. Dover. 2000. "Iron metabolism in pathogenic bacteria". Annu Rev Microbiol. vol. 54, no. p. 881-941.

Raymond, K. N., E. A. Dertz et S. S. Kim. 2003. "Enterobactin: an archetype for microbial iron transport". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 100, no. 7, p. 3584-8.

Raymond K. N. et E. A. Dertz. 2004. Iron Transport in Bacteria. Biochemical and physical properties of siderophores. Éditeur J.H. Crosa, A.R. Mey et S.M. Payne. Washington D.C. ASM Press. p3-17.

Raz, R., B. Chazan et M. Dan. 2004. "Cranberry juice and urinary tract infection". Clin Infect Dis. vol. 38, no. 10, p. 1413-9.

Ren, C. P., R. R. Chaudhuri, A. Fivian, C. M. Bailey, M. Antonio, W. M. Barnes et M. J. Pallen. 2004. "The ETT2 gene cluster, encoding a second type III secretion system from *Escherichia coli*, is present in the majority of strains but has undergone widespread mutational attrition". J Bacteriol. vol. 186, no. 11, p. 3547-60.

Rippere-Lampe, K. E., A. D. O'Brien, R. Conran et H. A. Lockman. 2001. "Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf(1)*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*". Infect Immun. vol. 69, no. 6, p. 3954-64.

Roberts, C. W., F. Roberts, R. E. Lyons, M. J. Kirisits, E. J. Mui, J. Finnerty, J. J. Johnson, D. J. Ferguson, J. R. Coggins, T. Krell, G. H. Coombs, W. K. Milhous, D. E. Kyle, S. Tzipori, J. Barnwell, J. B. Dame, J. Carlton et R. McLeod. 2002. "The shikimate pathway and its branches in apicomplexan parasites". J Infect Dis. vol. 185 Suppl 1, no. p. S25-36.

Roberts, J. A., B. I. Marklund, D. Ilver, D. Haslam, M. B. Kaack, G. Baskin, M. Louis, R. Mollby, J. Winberg et S. Normark. 1994. "The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is needed for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 91, no. 25, p. 11889-93.

Rollins, S. M., A. Peppercorn, L. Hang, J. D. Hillman, S. B. Calderwood, M. Handfield et E. T. Ryan. 2005. "*In vivo* induced antigen technology (IVIAT)". Cell Microbiol. vol. 7, no. 1, p. 1-9.

Ronald, A. 1996. "Sex and urinary tract infections". N Engl J Med. vol. 335, no. 7, p. 511-2.

Ronald, A. 2002. "The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens". Am J Med. vol. 113 Suppl 1A, p. 14S-19S.

Runyen-Janecky, L. J., S. A. Reeves, E. G. Gonzales et S. M. Payne. 2003. "Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition *in vitro* and in cultured cells". Infect Immun. vol. 71, no. 4, p. 1919-28.

Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard et J. R. Johnson. 2002. "IronN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*". Infect Immun. vol. 70, no. 12, p. 7156-60.

Saemann, M. D., T. Weichhart, W. H. Horl et G. J. Zlabinger. 2005. "Tamm-Horsfall protein: a multilayered defence molecule against urinary tract infection". Eur J Clin Invest. vol. 35, no. 4, p. 227-35.

Salyers, A.A. et D.D. Whitt. 2002. Bacterial Pathogenesis A molecular approach second edition. ASM press. Washington D.C. 539 Pages.

Schaeffer, A. J., N. Rajan, Q. Cao, B. E. Anderson, D. L. Pruden, J. Sensibar et J. L. Duncan. 2001. "Host pathogenesis in urinary tract infections". Int J Antimicrob Agents. vol. 17, no. 4, p. 245-51.

Schilling, J. D., M. A. Mulvey et S. J. Hultgren. 2001. "Dynamic interactions between host and pathogen during acute urinary tract infections". Urology. vol. 57, no. 6 Suppl 1, p. 56-61.

Schilling, J. D., S. J. Hultgren et R. G. Lorenz. 2002. "Recent advances in the molecular basis of pathogen recognition and host responses in the urinary tract". Int Rev Immunol. vol. 21, no. 4-5, p. 291-304.

Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour et T. S. Whittam. 1986. "Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics". Appl Environ Microbiol. vol. 51, no. 5, p. 873-84.

Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockett, D. E. Johnson, M. S. Sonnenberg, R. A. Welch et H. L. Mobley. 2004. "Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection". Infect Immun. vol. 72, no. 11, p. 6373-81.

Snyder L. et W. Champness. 1997. Molecular genetics of bacteria. Washington D.C. ASM Press. 504 pages.

Sorsa, L. J., S. Dufke, J. Heesemann et S. Schubert. 2003. "Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor". Infect Immun. vol. 71, no. 6, p. 3285-93.

Sprenkel, C., Z. Cao, Z. Qi, D. C. Scott, M. A. Montague, N. Ivanoff, J. Xu, K. M. Raymond, S. M. Newton et P. E. Klebba. 2000. "Binding of ferric enterobactin by the *Escherichia coli* periplasmic protein FepB". J Bacteriol. vol. 182, no. 19, p. 5359-64.

Stanley, P., V. Koronakis et C. Hughes. 1998. "Acylation of *Escherichia coli* hemolysin: a unique protein lipidation mechanism underlying toxin function". Microbiol Mol Biol Rev. vol. 62, no. 2, p. 309-33.

Stephens, D. L., M. D. Choe et C. F. Earhart. 1995. "*Escherichia coli* periplasmic protein FepB binds ferrienterobactin". Microbiology. vol. 141 (Pt 7), no. p. 1647-54.

Storz, G., S. Altuvia et K. M. Wassarman. 2005. "An abundance of RNA regulators". Annu Rev Biochem. vol. 74, no. p. 199-217.

Straus, D. et F. M. Ausubel. 1990. "Genomic subtraction for cloning DNA corresponding to deletion mutations". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 87, no. 5, p. 1889-93.

Sukhan, A., T. Kubori, J. Wilson et J. E. Galan. 2001. "Genetic analysis of assembly of the *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* type III secretion-associated needle complex". J Bacteriol. vol. 183, no. 4, p. 1159-67.

Swenson, D. L., N. O. Bukanov, D. E. Berg et R. A. Welch. 1996. "Two pathogenicity islands in uropathogenic *Escherichia coli* J96: cosmid cloning and sample sequencing". Infect Immun. vol. 64, no. 9, p. 3736-43.

Tarr, P. I., S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr., S. Jelacic, R. L. Habeeb, T. R. Ward, M. R. Baylor et T. E. Besser. 2000. "Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure". Infect Immun. vol. 68, no. 3, p. 1400-7.

Torres, A. G. et S. M. Payne. 1997. "Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7". Mol Microbiol. vol. 23, no. 4, p. 825-33.

Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch et S. M. Payne. 2001. "TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse". Infect Immun. vol. 69, no. 10, p. 6179-85.

Touati, D. 2000. "Iron and oxidative stress in bacteria". Arch Biochem Biophys. vol. 373, no. 1, p. 1-6.

Trent, M. S. 2004. "Biosynthesis, transport, and modification of lipid A". Biochem Cell Biol. vol. 82, no. 1, p. 71-86.

Uehling, D. T., D. B. Johnson et W. J. Hopkins. 1999. "The urinary tract response to entry of pathogens". World J Urol. vol. 17, no. 6, p. 351-8.

Uhlen, P., A. Laestadius, T. Jahnukainen, T. Soderblom, F. Backhed, G. Celsi, H. Brismar, S. Normark, A. Aperia et A. Richter-Dahlfors. 2000. "Alpha-haemolysin of uropathogenic *E. coli* induces Ca²⁺ oscillations in renal epithelial cells". Nature. vol. 405, no. 6787, p. 694-7.

Vaisanen-Rhen, V., J. Elo, E. Vaisanen, A. Siitonen, I. Orskov, F. Orskov, S. B. Svenson, P. H. Makela et T. K. Korhonen. 1984. "P-fimbriated clones among uropathogenic *Escherichia coli* strains". Infect Immun. vol. 43, no. 1, p. 149-55.

van der Woude, M. W. et A. J. Baumler. 2004. "Phase and antigenic variation in bacteria". Clin Microbiol Rev. vol. 17, no. 3, p. 581-611.

Vermeulen, C., A. Cross, W. R. Byrne et W. Zollinger. 1988. "Quantitative relationship between capsular content and killing of K1-encapsulated *Escherichia coli*". Infect Immun. vol. 56, no. 10, p. 2723-30.

- Wain, J., D. House, D. Pickard, G. Dougan et G. Frankel. 2001. "Acquisition of virulence-associated factors by the enteric pathogens *Escherichia coli* and *Salmonella enterica*". Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. vol. 356, no. 1411, p. 1027-34.
- Walsh, C.T. et C.G. Marshall. 2004. Iron Transport in Bacteria. Siderophore biosynthesis in bacteria. Éditeur J.H. Crosa, A.R. Mey et S.M. Payne. Washington D.C. ASM Press. p18-37.
- Warren, J. W., E. Abrutyn, J. R. Hebel, J. R. Johnson, A. J. Schaeffer et W. E. Stamm. 1999. "Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. Infectious Diseases Society of America (IDSA)". Clin Infect Dis. vol. 29, no. 4, p. 745-58.
- Wassenaar, T. M. et W. Gaastra. 2001. "Bacterial virulence: can we draw the line?" FEMS Microbiol Lett. vol. 201, no. 1, p. 1-7.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Sonnenberg et F. R. Blattner. 2002. "Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 99, no. 26, p. 17020-4.
- Wells, J. G., B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow et G. K. Morris. 1983. "Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype". J Clin Microbiol. vol. 18, no. 3, p. 512-20.
- Whitfield, C. et I. S. Roberts. 1999. "Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*". Mol Microbiol. vol. 31, no. 5, p. 1307-19.
- Winstanley, C. 2002. "Spot the difference: applications of subtractive hybridisation to the study of bacterial pathogens". J Med Microbiol. vol. 51, no. 6, p. 459-67.
- Wren, B. W. 2000. "Microbial genome analysis: insights into virulence, host adaptation and evolution". Nat Rev Genet. vol. 1, no. 1, p. 30-9.
- Yu, D., H. M. Ellis, E. C. Lee, N. A. Jenkins, N. G. Copeland et D. L. Court. 2000. "An efficient recombination system for chromosome engineering in *Escherichia coli*". Proc Natl Acad Sci U S A. vol. 97, no. 11, p. 5978-83.
- Zhang, L., B. Foxman et C. Marrs. 2002. "Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2". J Clin Microbiol. vol. 40, no. 11, p. 3951-5.
- Zhang, L., R. R. Chaudhuri, C. Constantinidou, J. L. Hobman, M. D. Patel, A. C. Jones, D. Sarti, A. J. Roe, I. Vlisidou, R. K. Shaw, F. Falciani, M. P. Stevens, D. L. Gally, S. Knutton, G. Frankel, C. W. Penn et M. J. Pallen. 2004. "Regulators encoded in the *Escherichia coli* type III secretion system 2 gene cluster influence expression of genes

within the locus for enterocyte effacement in enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7". Infect Immun. vol. 72, no. 12, p. 7282-93.

Zhou, D., W. D. Hardt et J. E. Galan. 1999. "*Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island". Infect Immun. vol. 67, no. 4, p. 1974-81.