

INRS – Institut Armand-Frappier

**Rôle et régulation du transporteur SitABCD pour la virulence et la
résistance au stress oxydatif chez la souche uropathogène CFT073**

par
Julie Proulx

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

Jury d'évaluation

Président du jury et
examineur interne

Rolf Morosoli, INRS/Institut Armand-Frappier

Examineur externe

J. Daniel Dubreuil
Faculté de médecine vétérinaire
Département de pathologie et de microbiologie
Université de Montréal (St-Hyacinthe)

Directeur de recherche

Charles M. Dozois, INRS/Institut Armand-Frappier

Résumé

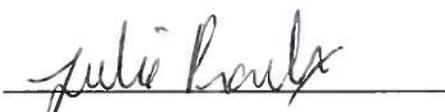
Les infections du tractus urinaire (ITUs) constituent l'une des infections bactériennes les plus courantes. Elles sont causées, dans la majorité des cas, par certaines souches d'*Escherichia coli* (souches uropathogènes ou extraintestinales). Les souches d'*E. coli* uropathogènes sont en effet responsables de plus de 80% des complications qui surviennent suite à ces infections (cystites, pyélonéphrites). Le présent projet de recherche avait pour but de caractériser le rôle du transporteur SitABCD, un transporteur de métaux de transition (manganèse et fer), dans la virulence et la résistance au stress oxydatif chez une souche uropathogène, ainsi que d'étudier plus en détail la régulation de ce système.

La souche uropathogène *E. coli* CFT073, ayant été isolée d'un cas de pyélonéphrite aiguë, a été utilisée pour l'infection de souris femelles grâce à un modèle d'ITU ascendante. Cette même souche a servi à l'étude du rôle du système SitABCD dans la résistance au stress oxydatif, réalisée à l'aide de différents produits générant des espèces réactives de l'oxygène, tels le H₂O₂, la plumbagine, la phénazine méthosulfate et la phénazine éthosulfate. Afin d'étudier la régulation du système, plus précisément le rôle du régulateur OxyR, des vecteurs fusionnant le promoteur *sitA* au gène *lacZ* ont été construits (nombre de copies moyen et d'intégration) et l'activité du promoteur a été évaluée chez différents mutants et ce dans différentes conditions de croissance. Finalement, l'interaction entre la protéine OxyR et le promoteur de *sitA* a été directement évaluée à l'aide d'un test d'interaction.

Les résultats obtenus démontrent une importance significative de SitABCD pour la virulence, seulement lors de la perte simultanée du système MntH (transporteur de manganèse). Ces données suggèrent un rôle partagé entre ces deux systèmes pour le transport des métaux, la résistance au stress oxydatif et la virulence. Par ailleurs, la perte de ces deux systèmes simultanément entraîne une augmentation de la sensibilité de la souche au stress oxydatif, qui semble être plus associée au H₂O₂. Étant donné l'implication du H₂O₂, le rôle d'OxyR, le régulateur de la réponse à ce composé, a été

évalué. La mesure du niveau d'expression du promoteur de *sitA*, évalué par le dosage de la β -galactosidase, a suggéré une augmentation de l'expression en présence de H_2O_2 , tant lors de la croissance sur milieu riche ou pauvre en ions. L'interaction spécifique entre la protéine OxyR et le promoteur *sitA* a donc été étudiée. Aucune interaction directe de la protéine OxyR au promoteur *sitA* n'a été observée.

Les résultats obtenus suggèrent que la présence des systèmes SitABCD et MntH est nécessaire pour une pleine virulence de la souche UPEC CFT073 et la résistance au stress oxydatif. De plus, malgré que l'ajout de H_2O_2 augmente l'expression du promoteur *sitA* en se basant sur les résultats d'expression des fusions transcriptionnelles, la protéine OxyR, régulateur de la réponse au H_2O_2 , ne semble pas être impliquée directement dans cette régulation.



Julie Proulx
Étudiante



Charles M. Dozois
Directeur de recherche

Remerciements

Je tiens d'abord à remercier mon directeur de recherche, Charles M. Dozois, sans qui la réalisation de ma maîtrise n'aurait pas été possible. En plus de me permettre d'accroître considérablement mon expertise en laboratoire et élargir mes connaissances scientifiques, j'ai eu la chance de travailler sur un projet très intéressant et d'assister à plusieurs congrès.

J'aimerais aussi dire un grand merci à Barbara Augustin et Annie Poirier, qui ont permis la réalisation des infections de tractus urinaire de souris. Leur aide m'a été très précieuse pour cette partie de mon projet. En plus de la mise au point de la technique dans le laboratoire, elles ont réalisé la plupart des inoculations.

Je remercie aussi tous les membres du laboratoire pour l'aide qu'ils m'ont apportée tout au long de mes expériences. Leurs conseils m'ont été essentiels afin de réaliser mes expériences avec succès. Je tiens aussi à remercier la Fondation Armand-Frappier et le Fonds de la Recherche en Santé du Québec pour leur soutien financier.

Finalement, je veux remercier ma famille et mes amis qui m'ont beaucoup encouragée. Je voudrais aussi dire un immense merci à mon copain, qui a toujours été là pour moi dans les moments difficiles et qui m'a soutenue et encouragée tout au long de mes études. Merci pour ta patience.

Liste des figures

Figure 1.1 : Modèle d'infection ascendante du tractus urinaire.....	12
Figure 1.2 : Représentation schématique de la maturation des IBCs chez une souche UPEC.....	30
Figure 1.3 : Configuration de la première boîte Fur élucidée.....	37
Figure 1.4 : Configuration de la boîte Fur réarrangée.....	37
Figure 1.5 : Mécanisme de régulation de <i>fur</i>	38
Figure 1.6 : Mécanisme de régulation du fer nouvellement acquis par RyhB et Fur.....	39
Figure 1.7 : Schéma comparatif des transporteurs SitABCD et MntH.....	45
Figure 1.8 : Configuration de la boîte MntR située sur les gènes sous son contrôle.....	46
Figure 1.9 : Le régulon OxyR.....	49
Figure 1.10 : Le régulon SoxRS.....	51
Figure 2.1 : Représentation schématique de l'amplification du produit de PCR servant à la mutation du gène <i>oxyR</i> par l'introduction de la cassette de résistance à la kanamycine.....	58
Figure 2.2 : Schéma du vecteur pCA24N et sites de clonage.....	66
Figure 2.3 : Fonctionnement de la sonde HisProbe TM -HRP.....	70
Figure 3.1 : Indice de compétition entre les souches CFT073 sauvage et CFT073 Δlac dans la vessie et les reins.....	75
Figure 3.2 : Indice de compétition entre les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta sitABCD$ dans la vessie et les reins.....	76
Figure 3.3 : Indice de compétition entre les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta mntH$ dans la vessie et les reins.....	77
Figure 3.4 : Indice de compétition entre les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ dans la vessie et les reins.....	78

Figure 3.5 : Site putatif de liaison de OxyR au promoteur du gène <i>sitA</i>	79
Figure 3.6 : Sensibilité au H ₂ O ₂ de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$).....	80
Figure 3.7 : Sensibilité au H ₂ O ₂ de la souche CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$	81
Figure 3.8 : Sensibilité à la plumbagine de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$).....	82
Figure 3.9 : Sensibilité à la plumbagine de la souche CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$	82
Figure 3.10 : Sensibilité à la phénazine méthosulfate de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$).....	83
Figure 3.11 : Sensibilité à la phénazine méthosulfate de la souche CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$	84
Figure 3.12 : Sensibilité à la phénazine éthosulfate de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$).....	84
Figure 3.13 : Sensibilité à la phénazine éthosulfate de la souche CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$	85
Figure 3.14 : Expression dans le temps du promoteur <i>sitA</i> chez les souches CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ transformées du vecteur pIJ221.....	86
Figure 3.15 : Expression dans le temps du promoteur <i>sitA</i> chez les souches CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ transformées du vecteur pIJ232.....	87
Figure 3.16 : Expression du promoteur <i>sitA</i> chez les souches CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ transformées du vecteur pIJ232 sur un milieu solide LB.....	88
Figure 3.17 : Expression du promoteur <i>sitA</i> chez les souches CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ transformées du vecteur pIJ232 sur un milieu solide M9-glucose.....	89

Figure 3.18 : Immunobuvardage de type Western confirmant la solubilité de la protéine OxyR.....	89
Figure 3.19 : Gel d'acrylamide montrant les interactions de la protéine OxyR et des différents promoteurs utilisés.....	90
Figure 3.20 : Immunobuvardage de type Western confirmant l'interaction de la protéine OxyR.....	91

Liste des tableaux

Tableau 2.1 : Souches d' <i>E. coli</i> utilisées.....	54
Tableau 2.2 : Liste des amorces utilisées pour les différentes expériences.....	57
Tableau 2.3 : Tableau présentant les plasmides utilisés.....	60
Tableau 2.4 : Composition du gel d'acrylamide.....	68
Tableau 3.1 : Nombre d'UFC/ml de l'inoculum de départ.....	74

Liste des abréviations

µg : microgramme

µl : microlitre

µm : micromètre

µM : micromolaire

ABU : *asymptomatic bacteruria* / bactériurie asymptomatique

ABC : cassette de liaison à l'ATP (dans l'ATPase des transporteurs ABC)

ADN : acide désoxyribonucléique

Ap : ampicilline

APEC : *avian pathogenic Escherichia coli* / *Escherichia coli* pathogènes aviaires

APS : ammonium persulfate

ARN : acide ribonucléique

ARNm : acide ribonucléique messenger

ARNs : petit acide ribonucléique

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP : adénosine triphosphate

CO₂ : dioxyde de carbone

Cm : chloramphénicol

CNF1 : *cytotoxic necrotizing factor 1* / facteur nécrotique cytotoxique 1

DAEC : *diffusely adherent Escherichia coli* / *Escherichia coli* d'adhérence diffuse

DHBS : 2,3-dihydroxybenzoyl sérine

DNaseI : désoxyribonucléase I

dNTP : désoxyribonucléotide triphosphate

D.O. : densité optique

E. coli : *Escherichia coli*

EAEC : *enteroaggregative Escherichia coli* / *Escherichia coli* entéroagréatives

ECNM : *Escherichia coli neonatal meningite* / *Escherichia coli* causant la méningite néonatale

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

EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique

EHEC : *enterohemorrhagic Escherichia coli* / *Escherichia coli* entérohémorragiques

EIEC : *enteroinvasive Escherichia coli* / *Escherichia coli* entéroinvasives

EPEC : *enteropathogenic Escherichia coli* / *Escherichia coli* entéropathogènes

EtBr : bromure d'éthidium

ETEC : *enterotoxigenic Escherichia coli* / *Escherichia coli* entérotoxigènes

ExPEC : *Escherichia coli* pathogènes extraintestinaux

Fe²⁺ : fer ferreux

Fe³⁺ : fer ferrique

GFP : *green fluorescent protein* / protéine fluorescente verte

GTPase : guanosine triphosphatase

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HOCl : acide hypochloreux

HRP : *horseradish peroxidase*

IBCs : *intracellular bacterial communities* / communautés bactériennes intracellulaires

IPTG : isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside

ITUs : infections du tractus urinaire

kDa : kiloDalton

LB : milieu Luria-Bertani

LPS : lipopolysaccharides

LTs : toxines thermolabiles

M : molaire

MAC : *membrane attack complex* / complexe d'attaque membranaire

Mb : mégabases

ml : millilitres

MLEE : *multilocus enzyme electrophoresis*

MLST : *multilocus sequence typing*

mM : millimolaire

MPO : myéloperoxydase

NGAL : *neutrophil-gelatinase-associated lipocalin* / lipocalin associé à la gélatinase des neutrophiles

Nm : nanomètres

Nramp : *Natural resistance-associated macrophage protein*

O₂⁻ : anion superoxyde

OH[•] : radical hydroxyle

ONPG : *O*-nitrophényl-β-D-galactopyranoside

ORF : *open reading frame* / cadre de lecture ouvert

PAIs : *pathogenicity islands* / îlots de pathogénicité

pb : paires de bases

PCR : *polymerase chain reaction* / réaction de polymérisation en chaîne

PFGE : *pulsed field gel electrophoresis*

REPEC : *rabbit enteropathogenic Escherichia coli* / *Escherichia coli* entéropathogènes du lapin

ROS : *reactive oxygen species* / espèces réactives de l'oxygène

SDS : dodécylsulfate de sodium

SPATEs : *serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae* / autotransporteurs serine protease des *Enterobacteriaceae*

SOD : superoxyde dismutase

STs : toxines thermostables

TBST : tampon contenant du Tris, du sodium et du Tween-20

Tc : tétracycline

TEMED : tétra-méthyl-éthylènediamine

TMP-SMX : triméthoprim-sulfaméthoxazole

UFC : unité formatrice de colonie

UPEC : *E. coli* uropathogènes ou pathogènes du tractus urinaire

UV : ultraviolet

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

Table des matières

Résumé	III
Remerciements	V
Liste des figures	VI
Liste des tableaux	IX
Liste des abréviations	X
Table des matières	XIII
Introduction	1
Chapitre 1. Revue de littérature	5
1.1 <i>Escherichia coli</i>	6
1.1.1 Différents pathotypes d' <i>Escherichia coli</i>	7
1.1.2 Classification sérologique des <i>E. coli</i>	8
1.1.3 Classification ECOR.....	9
1.2 Infections du tractus urinaire.....	10
1.2.1 Types d'infections du tractus urinaire.....	11
1.2.2 Modèles d'infections disponibles	13
1.2.2.1 Les modèles <i>in vitro</i>	14
1.2.2.2 Les modèles <i>in vivo</i>	15
1.2.3 Facteurs de virulence des UPEC.....	17
1.2.3.1 Molécules d'adhésion	17
1.2.3.1.1 <i>Fimbriae de type 1</i>	18
1.2.3.1.2 <i>Fimbriae P</i>	19
1.2.3.1.3 <i>Fimbriae S et FIC</i>	19
1.2.3.1.4 <i>Fimbriae de la famille Dr</i>	20
1.2.3.2 Toxines.....	20
1.2.3.2.1 <i>Hémolysine</i>	20
1.2.3.2.2 <i>Facteur CNF1</i>	21
1.2.3.3 Acquisition du fer.....	22
1.2.3.3.1 <i>Aérobactine</i>	22
1.2.3.3.2 <i>Entérobactine</i>	22
1.2.3.3.3 <i>Salmochelins</i>	23
1.2.3.3.4 <i>Yersiniabactine</i>	24
1.2.3.3.5 <i>Iha</i>	24

1.2.3.3.6 <i>IreA</i>	25
1.2.3.3.7 <i>ChuA</i>	25
1.2.3.4 Sérogroupes et sérotypes.....	25
1.2.3.5 Capsule.....	26
1.2.3.6 Résistance au sérum.....	27
1.2.3.7 Autotransporteurs.....	27
1.2.3.7.1 <i>Sat</i>	28
1.2.3.7.2 <i>PicU</i>	28
1.2.3.7.3 Antigène 43.....	29
1.2.3.8 Formation de biofilms.....	29
1.3 Importance du fer.....	31
1.3.1 Protéines liant le fer chez l'humain.....	32
1.3.2 Acquisition du fer chez les bactéries.....	34
1.3.3 Régulation du transport du fer.....	36
1.4 Importance du manganèse.....	40
1.4.1 Acquisition de manganèse chez les bactéries.....	41
1.4.1.1 Transporteur SitABCD et MntH.....	42
1.4.2 Régulation du transport de manganèse.....	45
1.5 Stress oxydatif.....	46
1.5.1 Stress oxydatif dans la défense de l'hôte.....	47
1.5.2 Substances chimiques causant du stress oxydatif.....	47
1.5.3 Défenses bactériennes contre les ROS.....	48
1.5.4 Régulation de la réponse au stress oxydatif.....	49
1.5.4.1 OxyR.....	49
1.5.4.2 SoxRS.....	51
1.5.4.3 Relations entre les régulateurs Fur, OxyR et SoxRS.....	52
Chapitre 2. Matériel et méthodes.....	53
2.1 Les souches utilisées.....	54
2.1.1 Souche UPEC CFT073.....	55
2.2 Milieux de croissance et milieux sélectifs.....	55
2.3 Réaction de polymérisation en chaîne.....	56
2.4 Mutagenèse.....	57
2.5 Transformations bactériennes.....	58
2.6 Constructions plasmidiques.....	58
2.7 Coinfections du tractus urinaire des souris.....	60

2.7.1 Préparation de l'inoculum.....	60
2.7.2 Anesthésie des souris.....	61
2.7.3 Cathétérisation.....	61
2.7.4 Injection de l'inoculum.....	62
2.7.5 Prélèvement des organes et de l'urine.....	62
2.7.6 Comptage bactérien.....	62
2.8 Tests de sensibilité aux stress oxydatif.....	63
2.9 Régulation du promoteur de <i>sitA</i> (<i>p_{sitA}</i>) par OxyR.....	64
2.9.1 Tests de dosage de la β -galactosidase.....	64
2.9.2 Surexpression et solubilisation d'OxyR.....	66
2.9.3 Interaction entre <i>p_{sitA}</i> et OxyR.....	68
2.9.4 Vérification par immunobuvardage de type Western.....	69
2.10 Analyses statistiques.....	71
Chapitre 3. Résultats	73
3.1 Coinfections du tractus urinaire des souris.....	74
3.2 Sensibilité au stress oxydatif.....	79
3.2.1 H ₂ O ₂	80
3.2.2 Plumbagine.....	81
3.2.3 Phénazine méthosulfate.....	83
3.2.4 Phénazine éthosulfate.....	84
3.3 Régulation de <i>p_{sitA}</i> par OxyR.....	85
3.3.1 Essais β -galactosidase.....	85
3.3.2 Surexpression et solubilisation de OxyR.....	89
3.3.3 Interaction entre <i>p_{sitA}</i> et OxyR.....	90
Chapitre 4. Discussion	93
4.1 Coinfections du tractus urinaire des souris.....	94
4.2 Sensibilité au stress oxydatif.....	97
4.3 Régulation de <i>p_{sitA}</i> par OxyR.....	102
Conclusion	107
Références	109

Introduction

Chez les humains et les animaux, le fer est très peu disponible directement, et se retrouve surtout complexé à des protéines de haute affinité. En effet, à un pH physiologique de 7,0 et en présence d'oxygène, le fer est insoluble et très toxique (Andrews *et al.*, 2003; Braun et Braun, 2002). Il est donc indispensable pour tout organisme de séquestrer le fer pour utilisation ultérieure de façon contrôlable à l'aide de diverses protéines. La transferrine, la lactoferrine ainsi que l'ovotransferrine jouent ce rôle et sont retrouvées dans les fluides biologiques ainsi que dans le blanc des œufs d'oiseaux (ovotransferrine). Leur constante d'affinité pour le fer est très élevée (10^{36}), ce qui leur confère la capacité de contrôler la concentration de fer libre dans l'organisme et donc de contrôler l'insolubilité et la toxicité de celui-ci (Ratledge et Dover, 2000).

Ce phénomène présente cependant un défi pour les bactéries pathogènes causant des infections chez l'hôte. Ces dernières ont aussi besoin de fer pour réaliser différentes réactions enzymatiques. En effet, les bactéries nécessitent une concentration interne de fer de 10^{-7} M à 10^{-5} M afin de fonctionner correctement. Cependant, il a été calculé que l'équilibre entre le fer complexé aux différentes protéines et le fer disponible se situe environ à 10^{-18} M (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000). Ainsi, la quantité de fer libre disponible pour une bactérie pathogène causant une infection est insuffisante pour supporter sa survie et sa prolifération dans l'hôte. D'autres métaux sont aussi essentiels pour les bactéries en tant que cofacteur d'enzymes, tel le manganèse. Les bactéries pathogènes ont donc développé différents mécanismes leur permettant d'acquérir le fer et le manganèse, tels les sidérophores, qui transportent spécifiquement le fer, et les systèmes de transport de type ABC, dont le système SitABCD fait partie. Le système SitABCD a été étudié chez quelques souches à ce jour : *Salmonella enterica* Sérovar Typhimurium, *Escherichia coli* APEC χ 7122, *Shigella flexneri* et *Yersinia pestis*. Ces études ont portées tant au niveau de l'évaluation du rôle dans la virulence de différents types d'infection que du rôle dans la résistance au stress oxydatif. Cependant, ces points n'ont pas été étudiés chez les souches d'*E. coli* causant des ITUs.

Les infections du tractus urinaire (ITUs) sont causées par des pathogènes extraintestinaux du genre *E. coli*, plus communément appelés des souches UPEC (*E. coli* pathogènes du tractus urinaire). Plusieurs centaines de millions de personnes sont affectées chaque année. *E. coli* est responsable de 80 à 90% des cas d'ITUs acquises à l'extérieur de l'hôpital et de 25% des cas d'ITUs nosocomiales (Russo *et al.*, 1999). De plus, approximativement la moitié des femmes développent une ITU avant d'atteindre la fin de leur vingtaine, et 20 à 30% de ces dernières auront des récurrences (Marrs *et al.*, 2005). Ce type d'infection représente donc un problème important tant au niveau de la santé que de l'économie. Communément, les manifestations cliniques les plus rencontrées sont les urétrites et les cystites (infections de la vessie). Cependant, plusieurs complications peuvent se manifester telles des pyélonéphrites aiguës, des abcès au niveau du rein ainsi que des bactériémies avec ou sans choc septique (Russo *et al.*, 1999). Les femmes, dû à leur anatomie, font partie des groupes plus susceptibles aux ITUs. De plus, les enfants et les personnes âgées, en raison de leur système immunitaire moins fort, sont aussi susceptibles à ce type d'infection (Warren, 1996). Bien que certains traitements soient efficaces, tels l'utilisation de triméthoprime-sulfaméthoxazole (TMP-SMX), l'émergence de la résistance à ces antibiotiques complique de plus en plus la lutte contre ces pathogènes (Gupta *et al.*, 1999).

La connaissance et l'identification des gènes nécessaires à une bactérie afin de déjouer le système immunitaire de l'hôte, de proliférer et de causer des maladies sont devenues essentielles afin de contrer ces dernières. Dans ce but, il devient nécessaire d'identifier les produits des gènes qui sont requis lors de ces processus. L'importance des facteurs de virulence est souvent déterminée à l'aide de modèles *in vivo* qui permettent de reproduire l'environnement retrouvé dans l'hôte.

Aucune étude jusqu'à ce jour n'a démontré l'importance de SitABCD dans le développement d'ITUs par *E. coli* tant au niveau de la virulence que de la résistance au stress oxydatif. De plus, aucune étude n'a démontré si OxyR a un rôle dans la régulation de SitABCD. Ce projet porte donc sur l'étude du rôle de SitABCD pour la virulence et la

résistance au stress oxydatif de la souche uropathogène CFT073, ainsi que la régulation du système par OxyR.

Avant de parler plus spécifiquement de ce projet de recherche, quelques aspects généraux seront abordés tels que : les caractéristiques générales de *E. coli*, les caractéristiques des souches UPEC, l'importance du fer et du manganèse et les différentes caractéristiques du stress oxydatif. Finalement, le protocole expérimental des différentes expériences effectuées, les résultats obtenus et l'analyse de ces derniers viendront mettre en lumière les nouvelles informations apportées par ce projet de recherche.

Chapitre 1. Revue de littérature

1.1 *Escherichia coli*

La bactérie *Escherichia coli* fut isolée pour la première fois en 1885 par un pédiatre autrichien nommé Theodor Escherich, au nom duquel l'espèce fut par la suite nommée en 1919. *E. coli* fait partie de la famille des *Enterobacteriaceae* et est caractérisé par sa forme de bâtonnet Gram-négatif, non sporulant, anaérobie facultatif et fermentant le lactose (Prescott *et al.*, 1995). *E. coli* est sans aucun doute l'un des microorganismes le mieux caractérisé et dont les mécanismes sont les mieux compris dans le secteur de la recherche bactérienne (Welch, 2006). Cette souche bactérienne se retrouve dans la flore normale au niveau du tractus gastro-intestinal des humains et des animaux, mais est aussi retrouvée dans le sol et l'eau. Lorsque présent dans ces deux derniers milieux, *E. coli* consiste en un indicateur de contamination fécale. Les souches normalement retrouvées dans le tractus gastro-intestinal sont pour la plupart des souches commensales, c'est-à-dire qu'elles font partie de la flore normale de l'intestin, et ne présentent aucun risque pour la santé. Cependant, plusieurs souches d'*E. coli* peuvent causer une variété de maladies infectieuses, tant au niveau de l'intestin que de sites extraintestinaux (Kaper *et al.*, 2004).

Ces souches pathogènes sont différenciées par les symptômes causés, l'épidémiologie, les observations microscopiques, l'interaction générée avec les cellules hôtes ainsi que les marqueurs génétiques uniques (Welch, 2006). En effet, *E. coli* possède la capacité d'acquérir de nouveaux gènes de virulence par l'entremise de plasmides ou de bactériophages. Il est donc possible de retrouver chez les souches pathogènes plusieurs îlots de pathogénicité (PAIs) qui sont absents chez les souches commensales (Dozois et Curtiss, 1999). Elles constituent des pathotypes différents. Malgré tout, environ 40% du génome est conservé entre les souches commensales (MG1655) et les souches pathogènes (EDL933 et CFT073) (Welch *et al.*, 2002).

1.1.1 Différents pathotypes d'*Escherichia coli*

Les différentes souches d'*E. coli* ont été classées en sept sous groupes nommés pathotypes¹ : les souches d'*E. coli* entéropathogènes (EPEC), les souches d'*E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les souches d'*E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les souches d'*E. coli* entéroagrégatives (EAEC), les souches d'*E. coli* entéroinvasives (EIEC), les souches d'*E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) et les souches d'*E. coli* pathogènes extraintestinaux (ExPEC) (Dozois et Curtiss, 1999; Kaper *et al.*, 2004; Marrs *et al.*, 2005). Les six premiers pathotypes constituent des pathogènes intestinaux, alors que le dernier pathotype regroupe les pathogènes extraintestinaux, comme son nom l'indique.

Les EPEC ont été les premières souches d'*E. coli* à former un pathotype distinct. Ces souches causent la diarrhée persistante chez les enfants et les animaux. Le phénotype d'attachement et effacement (destruction des microvillosités des cellules épithéliales intestinales lors de l'attachement de la bactérie) de ces souches est caractéristique. Les EHEC causent les colites hémorragiques et le syndrome urémique hémolytique. Le principal réservoir de ce pathotype est le tractus intestinal du bovin et plusieurs infections causées par ces souches ont été causées par la consommation de viande de bœuf mal cuite. Les ETEC causent la diarrhée chez les enfants, surtout dans les pays en voie de développement. Ces souches d'*E. coli* causent également la diarrhée du voyageur ainsi que les diarrhées porcines se développant après le sevrage. Ces souches produisent des toxines, thermolabiles (LTs) ou thermostables (STs) qui sont la principale cause de la diarrhée. Les EAEC causent la diarrhée persistante chez les enfants et les adultes des pays en voie de développement ou industrialisés. Un phénotype agrégatif, c'est-à-dire où les cellules adhèrent les unes aux autres, est spécifique à ce pathotype. Les DAEC causent également la diarrhée chez les jeunes enfants. Les EIEC sont génétiquement proches des espèces de *Shigella* spp. Ces souches causent la diarrhée et la dysenterie chez les humains

¹ Groupe de souches d'une espèce qui cause une même maladie en utilisant un ensemble commun de facteurs de virulence (Kaper, Nataro et Mobley, 2004).

et les primates. De plus, elles ont la capacité d'envahir les cellules épithéliales intestinales de l'hôte infecté (Dozois et Curtiss, 1999; Kaper *et al.*, 2004).

Parmi les différentes souches d'*E. coli*, certaines sont en mesure de coloniser des sites autres que l'intestin de l'hôte. Elles sont regroupées sous le nom d'ExPEC, les *E. coli* causant des infections extraintestinales (Russo et Johnson, 2000). Ce pathotype regroupe les *E. coli* causant des infections urinaires (UPEC), associés aux méningites néonatales (ECNM) et une panoplie d'autres souches causant une grande variété d'infections extraintestinales (infections intra abdominales, pneumonies, etc.) (Russo et Johnson, 2000). Une bactériémie accompagne fréquemment les infections à plusieurs de ces sites (Gransden *et al.*, 1990). Certaines souches ExPEC sont associées à des infections extraintestinales chez les animaux, par exemple les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC), qui causent l'aérosacculite et la cellulite aviaire chez la volaille. Certaines souches peuvent aussi causer la diarrhée chez le lapin (REPEC) (Dozois et Curtiss, 1999). Contrairement aux souches d'*E. coli* causant des infections intestinales, la présence des ExPEC chez l'hôte n'est pas suffisant pour causer l'infection. La bactérie doit tout d'abord atteindre un site extraintestinal (Russo et Johnson, 2000). La plupart des souches extraintestinales font partie du groupe phylogénétique B2 (section 1.1.3) (Picard *et al.*, 1999).

1.1.2 Classification sérologique des *E. coli*

Les différentes souches d'*E. coli* ne sont pas toutes composées des mêmes antigènes à leur surface. En effet, on retrouve une grande variation dans la production des polysaccharides de surface (Whitfield et Roberts, 1999). Le sérotypage est une technique qui est utilisée pour distinguer différentes souches de microorganismes (sérotypes) présentant des différences dans la composition antigénique d'une structure. Chez *E. coli*, trois types d'antigènes sont utilisés afin de classer les différentes souches : les lipopolysaccharides (O), les flagelles (H) et la capsule (K). L'antigène O constitue la chaîne latérale polysaccharidique s'étendant à l'extérieur de la membrane externe des bactéries Gram-négatif et fait partie du lipopolysaccharide (LPS), avec le lipide A et le

polysaccharide central (Prescott *et al.*, 1995). L'antigène H est composé de la flagelline et des protéines constituant le flagelle (Gyles, 1994). Finalement, les antigènes K sont des composantes de la capsule polysaccharidique bactérienne.

On retrouve au moins 167 sérogroupes O différents chez *E. coli*, plus de 80 polysaccharides K et plus de 50 antigènes H (Gyles, 1994; Whitfield et Roberts, 1999). Les différents sérotypes varient selon la composition au niveau du sucre, les liens spécifiques dans ceux-ci ainsi que la substitution de ces sucres par différents résidus des hydrates de carbone (Whitfield et Roberts, 1999). L'identification sérologique d'une souche pathogène permettait, il y a quelques années, de mieux identifier celle-ci lors d'infections, de suivre sa progression dans la population (épidémiologie ²) ainsi que découvrir sa provenance (Ochman et Selander, 1984a; Prescott *et al.*, 1995). De nos jours, des techniques moléculaires, telles le MLST (*Multi-locus Sequence Typing*) ou le PFGE (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*), sont plus fréquemment utilisées (Hilali *et al.*, 2000; Srinivasan *et al.*, 2007).

1.1.3 Classification ECOR

Afin de mieux comprendre la relation entre les différentes souches d'*E. coli*, commensales et pathogènes, des approches phylogénétiques ont été effectuées. La collection ECOR (*E. coli* reference collection) a été formée par Ochman et Selander et rassemble 72 souches d'*E. coli* représentant la diversité génétique de cette dernière. Ces souches ont été isolées d'une variété d'hôtes (animaux et humains) et de régions géographiques différentes (Ochman et Selander, 1984b).

Les 72 souches ont tout d'abord été classées en cinq groupes distincts, A, B1, B2, D et E, à l'aide de la technique « *Multi-locus enzyme electrophoresis* » (MLEE). Cette technique permet l'étude de la mobilité électrophorétique relative des variants alléliques de 38

² Étude des facteurs déterminants et influençant la fréquence et la distribution d'une maladie, d'une lésion ou d'autres événements relatifs à la santé, ainsi que l'étude de leurs causes dans une population humaine définie (Prescott, Harley et Klein, 1995).

enzymes métaboliques. Le groupe A rassemble en majorité des *E. coli* K-12 ainsi que certaines souches apparentées à celles-ci et qui proviennent en majorité des humains. Les souches retrouvées dans le groupe B1 ont été en grande partie isolées de mammifères autres que les primates. Dans le cas des souches du groupe B2, ces souches proviennent principalement des humains et autres primates (Herzer *et al.*, 1990). De plus, le groupe B2 est fortement divergent et une grande proportion des souches d'*E. coli* extraintestinales font partie de celui-ci (Picard *et al.*, 1999). Les souches retrouvées dans les groupes B2 et D ont les génomes les plus larges, dû à la présence de PAIs. Plusieurs facteurs de virulence sont associés à ces îlots, ce qui explique leur implication dans les infections extraintestinales, telle les infections du tractus urinaire (ITUs) (Boyd et Hartl, 1998). Donc, les groupes B2 et D représentent en majorité des souches virulentes, bien que les souches du groupe D le soient moins. Les groupes A et B1 correspondent aux souches avirulentes (Picard *et al.*, 1999). Le groupe E rassemble les souches qui n'ont pas été classées à ce jour (Herzer *et al.*, 1990).

1.2 Infections du tractus urinaire

Les infections du tractus urinaire (ITUs) présentent un important impact pour la société, tant au niveau économique qu'au niveau de la santé. En effet, les ITUs sont une des infections acquises en communauté les plus fréquentes (Marrs *et al.*, 2005; Russo et Johnson, 2003). De plus, une femme présente 60% de risque de développer une ITU au cours de sa vie (Foxman *et al.*, 2000; Manges *et al.*, 2001). On remarque aussi que 30% à 50% des femmes ont une ITU avant la fin de la vingtaine. Entre 20% et 30% des femmes ayant été infectées une première fois et ayant développé une ITU seront infectées à plus d'une reprise. Finalement, 5% de ces femmes développeront des infections de tractus urinaire récurrentes. En une année aux États-Unis, environ 1,6 milliards de dollars sont investis dans le traitement de ces infections (Foxman *et al.*, 2000; Marrs *et al.*, 2005).

Le tractus urinaire constitue le site extraintestinal le plus fréquemment infecté par *E. coli*. Cette bactérie peut être impliquée dans tous les types d'infections que nous verrons plus

en détail à la section suivante (section 1.2.1). En effet, *E. coli* cause 85% à 95% des infections de type cystites (infections de la vessie) chez les femmes, ce qui entraîne des coûts entre 6 et 8 millions de dollars seulement aux États-Unis. Dans le cas des pyélonéphrites (infections des reins), *E. coli* cause plus de 90% des cas, c'est-à-dire environ 250 000 seulement aux États-Unis, dont 100 000 constituent des cas requérant l'hospitalisation du patient (Russo et Johnson, 2003).

Certains facteurs de risque sont considérés comme jouant un rôle dans le développement initial d'ITUs. Par exemple, l'obstruction d'une structure essentielle, une anomalie fonctionnelle d'un organe, la présence d'un corps étranger tel un cathéter, et plusieurs autres facteurs tels le développement de diabète, la grossesse, une défaillance des reins, une transplantation ou encore un système immunitaire faible sont tous des facteurs de risque (Foxman *et al.*, 2000; Hooton, 2003). Par contre, les facteurs les plus impliqués lors de la récurrence d'une infection sont les facteurs de virulence inhérents à la bactérie et la gravité de l'infection initiale (Foxman, 1990).

1.2.1 Types d'infections du tractus urinaire

Chez la plupart des femmes en santé, le développement d'une ITU se produit de façon ascendante. La bactérie uropathogène se retrouve initialement dans l'intestin, où elle fait partie de la flore normale de cet environnement. Par la suite, la bactérie colonise la région vaginale, puis se rend à la vessie par l'urètre. La vessie est le site primaire d'infection dans 95% des cas d'ITUs. L'infection des reins peut ensuite se produire si la bactérie se propage par les uretères jusqu'à ces organes (Figure 1.1) (Mulvey, 2002; Warren, 1996). Les ITUs hématogènes ou dites descendantes représentent un faible pourcentage des infections urinaires. Dans ce type d'infection, la bactérie est délivrée au tractus urinaire, plus précisément aux reins, par la circulation sanguine. Les espèces causant généralement ce type d'infection sont *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* spp. et *Candida* spp. (Warren, 1996). Un certain nombre d'autres espèces peuvent être responsables d'ITUs, tels *Staphylococcus saprophyticus*, *Klebsiella* spp., *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens*, etc. (Ronald, 2002).

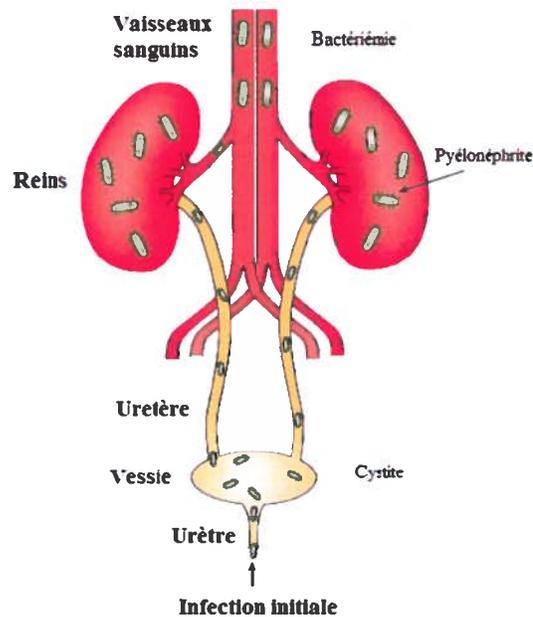


Figure 1.1 : Modèle d'infection ascendante du tractus urinaire (Kaper *et al.*, 2004).

Deux types d'ITUs sont distingués : les ITUs sans complications et les ITUs avec complications. Le premier cas représente les ITUs se développant chez les personnes en santé, c'est-à-dire qu'elles présentent un tractus urinaire normal et aucune maladie systémique pouvant servir de prédispositions à des infections bactériennes. Dans le deuxième cas, les ITUs se produisent chez un patient présentant un corps étranger (cathéter), une anomalie fonctionnelle du tractus urinaire ou encore dont le système immunitaire est affaibli (Warren, 1996).

Les ITUs se distinguent en plusieurs types de manifestations cliniques de l'infection. Tout d'abord, la bactérie uropathogène peut causer une cystite, c'est-à-dire une infection de la vessie. Cette infection est caractérisée par une difficulté au niveau de la miction et un besoin fréquent et urgent d'uriner. Ensuite, lors de l'ascension de la bactérie aux reins, celle-ci peut causer une pyélonéphrite. Cette infection des reins se traduit par plusieurs symptômes tels une douleur au flanc, de la fièvre, des vomissements, des chaleurs et des malaises. Une pyélonéphrite peut aussi mener à des complications importantes telles la bactériémie, et ce dans 30% des cas. Une bactériémie consiste en des cas où l'infection se propage dans le sang. Finalement, certaines personnes peuvent être infectées au niveau de

l'urine (bactériurie). Ce type d'infection ne cause généralement pas de symptômes et est donc asymptomatique (Warren, 1996). Les souches causant ce type d'infection sont nommées ABU (*asymptomatic bacteriuria*). Les patients colonisés par ces souches n'ont pas de symptômes et ne nécessitent généralement pas de traitement. Ces souches permettraient même de prévenir des infections urinaires par des souches plus virulentes (Roos *et al.*, 2006b).

Plusieurs traitements efficaces sont disponibles afin de combattre les ITUs. Le traitement habituellement administré aux personnes ayant une ITU sans complications est un mélange de deux antibiotiques, le triméthoprim-sulphaméthoxazole (TMP-SMX). Ce traitement est efficace dans la plupart des cas. Cependant, les études ont démontré que de plus en plus de résistances se développent. En effet, la résistance à ce traitement était de plus de 18% en 1996. Les médecins ont donc commencé à prescrire des fluoroquinolones, qui étaient généralement réservées aux ITUs avec complications (Gupta *et al.*, 1999; von Baum et Marre, 2005). Cependant, de plus en plus de résistance à ces derniers antibiotiques se développe aussi, allant même jusqu'à 36% en Grèce (Chaniotaki *et al.*, 2004). La nitrofurantoïne et la fosfomycine sont aussi des alternatives maintenant utilisées (Hooton, 2003; von Baum et Marre, 2005). Certains outils plus performants sont présentement développés afin de faciliter la détection des résistances chez la souche en cause avant le traitement du patient. En effet, une puce génotypique à ADN a été développée et permet d'obtenir rapidement de l'information sur la sensibilité d'*E. coli* à la fluoroquinolone. La détection peut être réalisée de manière rapide avec une haute sensibilité et serait, selon les auteurs, applicable au diagnostique clinique (Yu *et al.*, 2007).

1.2.2 Modèles d'infections disponibles

Les études visant la meilleure compréhension des mécanismes régissant les ITUs ont mené à la découverte de plusieurs facteurs contribuant à la virulence des souches et à l'établissement de l'infection. Celles-ci ont été possible grâce à l'établissement de modèles *in vitro* et *in vivo*.

1.2.2.1 Les modèles in vitro

Les modèles *in vitro* mis au point ont permis d'étudier plusieurs processus liés aux ITUs tels la variation de phase fimbriaire (modulation de l'expression des fimbriae chez *E. coli*), le tropisme tissulaire des différentes adhésines retrouvées chez les souches UPEC ainsi que le degré d'invasion de celles-ci. Par exemple, la variation de phase fimbriaire peut être étudiée à l'aide de l'immunofluorescence. Cette méthode utilise des anticorps reconnaissant le fimbriae à l'étude (fimbriae de type 1, fimbriae P, etc.) auxquels un deuxième anticorps se lie. Ce dernier consiste en un IgG couplé à une molécule fluorescente telle la fluorescéine ou la rhodamine et permet la visualisation des structures par microscopie. Lorsque l'on souhaite étudier la cinétique de cette variation fimbriaire, une technique de fractionnement peut être utilisée. Celle-ci consiste en l'isolement de sous-populations de bactéries exprimant un fimbriae particulier par l'absorption à des érythrocytes ou des levures. Cette technique permet l'obtention d'une population de cellules bactériennes uniformes à environ 96% afin d'effectuer par la suite des études d'adhérence. Dans le cas de l'étude du tropisme tissulaire des différentes adhésines retrouvées chez les souches UPEC, il est possible d'utiliser des coupes de rein humain qui permettent d'évaluer la spécificité et l'adhésion d'une adhésine aux différentes structures rénales (Nowicki, 1996).

Des cellules en culture provenant de tissus ou d'organes impliqués dans le développement des ITUs, tels des cellules épithéliales provenant de la vessie ou des reins, des érythrocytes, etc., peuvent également être utilisées pour ces études. Ces cellules permettent aussi d'étudier la cytotoxicité des différentes souches (Guyer *et al.*, 2000; Landraud *et al.*, 2000; Mills *et al.*, 2000) ainsi que l'invasion que celles-ci effectuent lors d'une ITU (Roos *et al.*, 2006a; Selvarangan *et al.*, 2000).

Une autre possibilité, développée récemment par Smith et ses collaborateurs, consiste en l'utilisation d'un organoïde en trois dimensions (Smith *et al.*, 2006). Cette méthode permet le rassemblement de cellules individuelles en une structure tridimensionnelle. La clé de ce système réside dans la possibilité des cellules à rester en suspension à l'aide d'une aération ne produisant pas de bulles. Par exemple, des cellules humaines de vessie

cultivées à l'aide de cette technologie durant dix jours permettent le développement d'un urothélium exprimant les marqueurs cellulaires et l'organisation normalement retrouvés chez l'organe véritable. Ces organoïdes sont caractérisés par leur polarité, la formation d'une matrice extracellulaire et une différenciation spécifique à l'organe. La structure macroscopique résultante présente plusieurs attributs cellulaires identiques au tissu *in vivo* correspondant et constitue un intermédiaire entre les expériences utilisant les lignées cellulaires et celles effectuées chez les modèles animaux (Smith *et al.*, 2006).

1.2.2.2 Les modèles in vivo

Des modèles animaux peuvent également être utilisés afin de tenter de reproduire le processus de l'infection chez l'humain. Ces modèles permettent d'obtenir des informations vitales qui s'avèrent impossibles d'obtenir lors des études *in vitro*. Ces études chez les animaux permettent de déterminer les différentes interactions entre l'hôte et le pathogène, d'étudier l'établissement de l'infection, l'attachement initial, puis ultérieurement aux différentes surfaces de l'hôte etc. Bref, l'étude de la dynamique tout au long de l'infection n'est possible que par l'entremise d'un modèle *in vivo*.

Plusieurs facteurs doivent être considérés afin de choisir un modèle animal adéquat à l'étude désirée. Des animaux en santé et bien nourris, évoluant dans un environnement propre et bien contrôlé, ainsi que n'étant colonisés par aucun pathogène préalablement à l'étude, sont des facteurs importants à considérer. De plus, la susceptibilité à l'infection peut différer selon le type d'animal, le sexe ainsi que l'âge de celui-ci. La taille de l'animal peut aussi jouer un rôle déterminant dans le choix du modèle, par exemple si certaines procédures s'avèrent ardues chez un animal de trop petite taille. Il est aussi possible d'utiliser des animaux provenant d'une lignée *inbred* afin d'obtenir des résultats jugés plus homogènes. Tous ces facteurs jouent un rôle dans le choix du modèle (Johnson et Russell, 1996).

Plusieurs modèles animaux sont utilisés dans l'étude des ITUs et ont permis d'élucider certains mécanismes de l'infection. Par exemple, des chiens (Rocha, 1963), des porcs, des lapins (Stotter *et al.*, 1975), des rats (Fierer *et al.*, 1971), des singes ainsi que des souris (Hagberg *et al.*, 1983b) ont été utilisés comme modèle afin d'étudier les ITUs. Certaines limites sont présentes pour chacun de ces modèles. Par exemple, l'utilisation des chiens posait problème dû au fait que l'établissement de pyélonéphrite était impossible, malgré toutes les tentatives (ligature de l'urètre, meurtrissures du rein, etc.) (Rocha, 1963). Seules des infections de type cystites étaient produites. Toutefois, plusieurs études ont été réalisées grâce à l'utilisation de rats, dû en grande partie à leur faible coût ainsi qu'à la facilité de les loger. De plus, ceux-ci développent des pyélonéphrites spontanées. Des recherches évaluant le potentiel de nouveaux vaccins et traitements par antibiotiques ainsi que l'implication de facteurs bactériens dans le développement des ITUs ont été effectuées à l'aide de ce modèle animal (Johnson et Russell, 1996).

Maintenant, la route d'infection ascendante des bactéries étant mieux caractérisée, certains modèles animaux ont été sélectionnés car ils reproduisent adéquatement l'infection retrouvée chez les humains. Les souris et les singes semblent bien remplir ce rôle. Une des raisons expliquant ce choix est la présence de récepteurs digalactosides similaires à ceux retrouvés au niveau du tractus urinaire des humains. Ces récepteurs constituent le site de liaison des fimbriae P exprimés par les souches *E. coli* uropathogènes causant des pyélonéphrites, ce qui permettraient à ces animaux de développer ce type d'infection (Johnson et Russell, 1996; Kallenius *et al.*, 1981; Roberts *et al.*, 1994). La route ascendante semble représenter la route empruntée par les bactéries lors de l'établissement des ITUs chez l'humain et ces deux modèles permettent la reproduction de cette route sans nécessiter de manipulations du tractus urinaire. Cependant, étant donné le faible coût d'achat et de soins nécessaires aux souris, ce modèle constitue le meilleur choix. De plus, elles sont disponibles en grandes quantités chez plusieurs fournisseurs. Les singes, quant à eux, ne devraient être utilisés que dans les études finales de confirmations des résultats en raison de leurs similitudes aux humains ainsi que leur coût particulièrement élevé (Johnson et Russell, 1996).

1.2.3 Facteurs de virulence des UPEC

Une grande variété de facteurs de virulence permet aux souches d'*E. coli* UPEC (faisant partie des souches ExPEC comme mentionné à la section 1.1.1) d'établir une infection chez l'hôte. Plusieurs des gènes codant pour ces facteurs de virulence se retrouvent sur les PAIs présents chez ces souches pathogènes, mais qui ne sont pas retrouvés chez les souches commensales. Ces grandes régions d'ADN peuvent contenir des gènes codant pour des adhésines, des toxines, des systèmes d'importation du fer, etc. (Dozois et Curtiss, 1999; Hacker et Kaper, 2000).

1.2.3.1 Molécules d'adhésion

Plusieurs adhésines sont communément associées aux souches UPEC. Celles le plus fréquemment retrouvées sont les fimbriae de type 1, les fimbriae P, les fimbriae S et F1C ainsi que les fimbriae faisant partie de la famille Dr. Celles-ci permettent à la bactérie de se fixer sur des structures ou tissus spécifiques de l'hôte (Hacker et Kaper, 2000). L'attachement des bactéries aux cellules de l'hôte est considéré comme l'étape primordiale nécessaire à l'établissement de l'infection et précèdent l'invasion des tissus dans plusieurs des cas (Johnson, 1991). L'adhérence est importante lors de l'établissement d'ITUs. En effet, le constant flux d'urine demande aux bactéries de bien s'attacher aux structures de l'hôte afin de ne pas être tout simplement expulsées. De plus, le tractus urinaire présente une certaine diversité de microenvironnements dans les différents sites anatomiques, ayant une variété de structures exprimées à la surface. Les bactéries voulant coloniser ces sites doivent donc avoir des molécules spécifiques à chacune de ces différentes structures. Une adhésine efficace pour un site ne sera pas nécessairement de même efficacité pour un autre site (Donnenberg et Welch, 1996). Les souches UPEC présentent donc plusieurs types d'adhésines, qui seront présentées dans les sections suivantes.

1.2.3.1.1 Fimbriae de type 1

Les fimbriae de type 1 sont les plus prévalents. Ils sont retrouvés chez plusieurs souches faisant partie des entérobactéries et se retrouvent chez presque toutes les souches d'*E. coli*, indépendamment de leurs sources (Donnenberg et Welch, 1996). Ils sont de forme cylindrique avec un diamètre d'environ 7 nm et une longueur d'environ 1 µm. Ces fimbriae sont codés par les gènes *fim*, regroupant neuf gènes : cinq gènes structuraux (*fimA*, *fimI*, *fimF*, *fimG*, *fimH*), une chaperonne (*fimC*), un point d'ancrage à la membrane externe (*fimD*) et des facteurs de régulation (*fimB* et *fimE*) (Schilling *et al.*, 2001). La majorité du fimbriae est formé d'une répétition de sous-unités FimA, présentant à l'extrémité la protéine de reconnaissance FimH. Le fimbriae de type 1 reconnaît le D-mannose retrouvé chez les récepteurs glycoprotéiques exprimés chez plusieurs types cellulaires différents (Bergsten *et al.*, 2005; Donnenberg et Welch, 1996; Mulvey, 2002). Par exemple, les érythrocytes de plusieurs espèces possèdent des récepteurs auxquels les fimbriae de type 1 peuvent se lier (Johnson, 1991). Ils sont aussi en mesure de lier une grande variété de structures telles la fibronectine, le collagène, la laminine et certaines structures retrouvées sur les macrophages (Bergsten *et al.*, 2005).

Au niveau du tractus urinaire, les interactions avec les cellules uroépithéliales à l'aide de FimH jouent un rôle essentiel dans l'habilité des souches UPEC à coloniser la vessie et causer l'infection (Connell *et al.*, 1996; Mulvey *et al.*, 1998). Les bactéries exprimant les fimbriae de type 1 adhèrent en particulier aux muqueuses du tractus urinaire (Donnenberg et Welch, 1996), et seraient plutôt associées aux infections de type cystites (Kaper *et al.*, 2004). Certaines études ont démontré, à l'aide d'un modèle d'infection murine, qu'une souche bactérienne présentant des fimbriae de type 1 colonise mieux la vessie qu'une souche où ceux-ci sont absents (Hultgren *et al.*, 1985). Cependant, le rôle des fimbriae de type 1 dans le tractus urinaire chez l'humain reste incertain.

1.2.3.1.2 Fimbriae P

Les fimbriae P sont encodés par un groupe de gènes nommés *pap* (pyelonephritis-associated pili) comportant 11 gènes dont six encodent des protéines structurales (*papA*, *papH*, *papK*, *papE*, *papF*, *papG*) (Mulvey, 2002). Les fimbriae P sont les mieux étudiés parmi les fimbriae retrouvés chez *E. coli* causant des ITUs (Donnenberg et Welch, 1996). Leur structure, semblable à celle des fimbriae de type 1, consiste en un filament cylindrique d'environ 7 nm de diamètre. Celui-ci est formé d'une répétition de la sous-unité PapA et est ancré dans la membrane à l'aide de la protéine PapH. L'adhésine, PapG, est située à l'extrémité du fimbriae. Celle-ci reconnaît les récepteurs glycolipidiques exprimés par les cellules de l'hôte. Le récepteur minimal nécessaire à la liaison du fimbriae P est le GbO3 (globotriasylicéramide) qui est constitué d'un noyau digalactoside (Gal α 1-4Gal β), lié à un groupe céramide par un résidu β -glucose (Stromberg *et al.*, 1990; Stromberg *et al.*, 1991). On retrouve ces récepteurs sur les érythrocytes et les cellules rénales de l'hôte. Ceci a permis d'établir que ces fimbriae sont plus fréquemment associés avec les souches UPEC causant des cas de pyélonéphrite (Bergsten *et al.*, 2005; Donnenberg et Welch, 1996; Mulvey, 2002). En effet, l'adhésine PapG n'est pas nécessaire à la colonisation de la vessie, mais est essentielle pour les souches UPEC causant des pyélonéphrites chez le singe au niveau de l'adhésion aux tissus rénaux (Mulvey, 2002; Roberts *et al.*, 1994).

1.2.3.1.3 Fimbriae S et F1C

Les fimbriae S et F1C sont très apparentés et exprimés par certaines souches UPEC (Johnson, 1991). Les fimbriae de type S sont composés d'une répétition de sous-unités SfaA, additionné de trois sous-unités mineures, SfaG, SfaH et SfaS. SfaS constitue l'adhésine située à l'extrémité du fimbriae et est en mesure de se lier à des récepteurs présentant des résidus de l'acide sialique. Ces récepteurs sont retrouvés sur les cellules épithéliales rénales ainsi que sur les cellules endothéliales vasculaires. La sous-unité SfaA possède aussi des domaines permettant de se lier aux cellules hôtes, plus particulièrement aux glycolipides des cellules endothéliales et au plasminogène. Les fimbriae de type S sont fréquemment associés à des souches d'*E. coli* causant des septicémies, des méningites et des ITUs ascendantes, incluant les pyélonéphrites. Ces fimbriae pourraient

aussi avoir un rôle dans les infections de type cystites puisque l'on retrouverait des résidus d'acide sialique sur la surface de la vessie (Mulvey, 2002). Les gènes *sfa* sont retrouvés plus spécifiquement chez les souches faisant partie du groupe phylogénétique B2 (Boyd et Hartl, 1998).

Les fimbriae F1C sont codés par les gènes *foc* et la sous-unité majeure les composant est FocA. Ils peuvent se lier au β -GalNac-1 et au 4 β -Gal sur les glycolipides exprimés à la surface de certaines cellules situées au niveau du rein, en plus de se lier aux cellules endothéliales de la vessie et des reins (Johnson *et al.*, 2005c; Mulvey, 2002; Snyder *et al.*, 2005).

1.2.3.1.4 Fimbriae de la famille Dr

Tous les membres de cette famille partagent un même récepteur, une glycoprotéine membranaire qui protège les tissus hôtes des dommages pouvant être causés par l'activation du complément (Donnenberg et Welch, 1996). Plus précisément, ces fimbriae reconnaissent une ou plusieurs des quatre petites séquences consensus de 60 acides aminés présentes chez cette glycoprotéine. Ce récepteur est retrouvé sur les érythrocytes ainsi que sur certains tissus tel l'uroépithélium (Mulvey, 2002). Ces fimbriae sont associés avec les cystites. (Johnson, 1991)

1.2.3.2 Toxines

1.2.3.2.1 Hémolysine

L'hémolysine alpha est codée par un opéron comprenant quatre gènes *hly* (*hlyCABD*). Le gène *hlyA* code pour l'hémolysine, tandis que la protéine HlyC est indispensable à l'activation de l'hémolysine avant sa sécrétion. La protéine HlyB permet à l'hémolysine d'être sécrétée dans le périplasme, alors que la sécrétion à l'extérieur de la membrane externe se produit de façon passive à l'aide de HlyD. L'hémolysine alpha (HlyA) lyse les érythrocytes de la majorité des mammifères et des poissons. L'hémolysine s'insère dans une membrane lipidique et produit des pores qui augmentent la perméabilité des érythrocytes aux ions Ca^{2+} , K^+ , au mannitol et au sucrose et conduisent ultimement à la

lyse du globule rouge. De plus, l'hémolysine est toxique pour une variété de types cellulaires de l'hôte et contribue à l'inflammation, aux dommages causés aux tissus et à l'affaiblissement des défenses de l'hôte. En effet, les monocytes et les granulocytes sont très sensibles à l'hémolysine (Donnenberg et Welch, 1996; Johnson, 1991).

Plusieurs études ont démontré que l'hémolysine alpha est exprimée *in vivo* durant une ITU. La production de l'hémolysine alpha est davantage associée aux patients étant atteints de pyélonéphrites (Johnson, 1991). Une étude démontrant la très grande sensibilité des tubules rénaux à l'hémolysine avance l'hypothèse que celle-ci détruit ces structures *in vivo*, menant à une invasion par *E. coli* dans les tissus plus profond, ce qui causerait une pyélonéphrite (Donnenberg et Welch, 1996; Warren *et al.*, 1995).

1.2.3.2.2 Facteur CNF1

Le facteur CNF1 (facteur nécrotique cytotoxique) est une toxine protéique qui est associée aux sérotypes d'*E. coli* qui sont communément isolés des ITUs sérieuses. Le facteur CNF1 est presque toujours associé à l'hémolysine alpha chez les souches UPEC (Donnenberg et Welch, 1996; Yamamoto, 2007). Tout comme celle-ci, il est codé sur un PAI chez les UPEC (Hacker et Kaper, 2000; Landraud *et al.*, 2004). Le mode d'action semble être relié en partie à la réorganisation d'actine en de longs filaments épais (Donnenberg et Welch, 1996; Oswald *et al.*, 1994). Brièvement, le facteur CNF1 est relâché dans l'environnement par la bactérie. L'attachement de la toxine à son récepteur présent à la surface de la cellule (précurseur du récepteur de la laminine) permet par la suite l'entrée de CNF1 dans les endosomes. À l'aide de l'environnement acide retrouvé à l'intérieur de ces derniers, la toxine est en mesure de transloquer son domaine catalytique à l'intérieur du cytosol de la cellule, et par la suite modifier la GTPase Rho (Landraud *et al.*, 2004). CNF1 confère un plus grand pouvoir d'invasion aux souches UPEC en permettant leur entrée dans les cellules épithéliales et causant ainsi la destruction du tissu uroépithélial (Landraud *et al.*, 2004).

1.2.3.3 Acquisition du fer

1.2.3.3.1 Aéro bactéine

L'aéro bactéine est un sidéro phore hydroxamate qui est une petite molécule sécrétée par les bactéries capable d'extraire le Fe^{3+} des molécules de l'hôte séquestrant le fer. Comparativement à l'entérobactine, l'aéro bactéine est plus stable et plus soluble. De plus, l'aéro bactéine est constamment recyclée sans hydrolyse, et elle délivre le fer directement aux sites d'utilisation. Finalement, un niveau de fer plus élevé active sa production comparativement à l'entérobactine. Les gènes codant pour la synthèse de l'aéro bactéine sont présents chez les souches UPEC lors des cas de cystites (49%), pyélonéphrites (73%) et bactériémies (58%) (Johnson, 1991). Il a été démontré que les souches d'*E. coli* produisant le sidéro phore aéro bactéine étaient en mesure de croître plus rapidement dans l'urine que les souches ne produisant pas ce sidéro phore (Montgomerie *et al.*, 1984).

1.2.3.3.2 Entérobactine

L'entérobactine est un sidéro phore de type catécholates qui a été découvert chez *E. coli* en 1970 (O'Brien et Gibson, 1970). Cette molécule est sécrétée par la bactérie en réponse à un stress ferrique. La structure moléculaire de l'entérobactine consiste en un trimère cyclique composé de 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS) et possède, parmi les composés naturels, la plus grande affinité pour le fer (Williams *et al.*, 2006). Une fois cyclisé, le sidéro phore peut lier un atome ferrique à l'aide de ces trois groupes catécholates. La biosynthèse et le transport de l'entérobactine sont codés par 14 gènes, soit *entD*, *fepA*, *fes*, *entF*, *entF*, *fepE*, *fepC*, *fepD*, *fepB*, *entS*, *entC*, *entE*, *entB* et *entA* (Crosa et Walsh, 2002). Jusqu'à ce jour, l'implication de l'entérobactine pour la virulence des bactéries est toujours nébuleuse. En effet, bien que plusieurs études aient démontré l'importance au niveau de la virulence de l'entérobactine, certains groupes ont aussi obtenu des résultats contraires. Benjamin et ses collaborateurs ont démontré que l'entérobactine était nécessaire pour la croissance dans le sérum murin. Cependant, celle-ci ne semblait pas importante pour la virulence des souches de *Salmonella* Typhimurium qui causent la typhoïde chez la souris (Benjamin *et al.*, 1985). De plus, Torres et ses collaborateurs ont démontré que la souche *E. coli* CFT073 mutante pour la production de l'entérobactine est toujours en mesure d'infecter la vessie et les reins dans le modèle

murin d'infection du tractus urinaire ascendantes (Torres *et al.*, 2001). Cette inefficacité lors d'une infection *in vivo* pourrait s'expliquer par le fait que l'entérobactine est captée par le sidéocalin produit par l'hôte, et s'avère donc inutilisable par la bactérie (Goetz *et al.*, 2002).

1.2.3.3 Salmochelines

Les salmochelines sont un autre type de sidérophore catécholate pouvant être retrouvé chez les souches UPEC, et sont codées par les gènes *iroBCDEN* (Bister *et al.*, 2004). Les salmochelines sont un dérivé de l'entérobactine, puisque c'est la glycosylation du DHBS qui permet la formation de celles-ci (Hantke *et al.*, 2003). Il existe sept composés membres de la famille des salmochelines : SX, S0, S1, S2, S3, S4 et S5. Le composé S4 constitue en fait le sidérophore et les autres composés sont dérivés de ce dernier (Bister *et al.*, 2004). L'organisation génétique de ces gènes consiste en deux régions convergentes, soit un opéron *iroBCDE*, présentant un promoteur en amont de *iroB*, et le gène *iroN* possédant son propre promoteur. Suite à une analyse des promoteurs des gènes *iroB* et *iroN*, un site putatif de liaison du régulateur Fur a été découvert, suggérant une régulation par ce dernier (Baumler *et al.*, 1998; Baumler *et al.*, 1996). Le gène *iroB* code pour une glycosyl transférase, le gène *iroC* est possiblement responsable de l'export des salmochelines et les gènes *iroD* et *iroE* sont des estérases putatives. Finalement, le gène *iroN* code pour un récepteur de sidérophore de type catécholate. Sa prévalence est plus grande chez les souches UPEC que chez les souches intestinales (Bauer *et al.*, 2002; Russo *et al.*, 1999).

On retrouve en général les salmochelines plus fréquemment chez les souches UPEC que chez les souches causant des infections au niveau de l'intestin (Valdebenito *et al.*, 2005). De plus, *IroN* est considéré comme un facteur de virulence puisqu'il augmente la virulence des souches le possédant lors d'une ITU dans le modèle murin. En effet, la souche uropathogène CP9 mutante pour le gène *iroN* était significativement moins capable de proliférer dans la vessie, les reins et l'urine comparativement à la souche sauvage lors d'une infection en compétition dans le modèle murin d'infection du tractus urinaire ascendante (Russo *et al.*, 2002).

1.2.3.3.4 Yersiniabactine

La yersiniabactine a tout d'abord été découverte chez le genre *Yersinia* et est codée par les gènes *ybt*. Celle-ci est présente sur un PAI et a aussi été retrouvée près du gène *asnT* de l'ARNt de plusieurs pathotypes d'*E. coli*, particulièrement ceux impliqués dans les bactériémies et les urosepticémies. Ce PAI est retrouvé chez 93% des souches d'*E. coli* comprises dans les groupes B2 et D de la collection ECOR (Clermont *et al.*, 2001). Le récepteur de la yersiniabactine, FyuA (*Ferric yersiniabactin uptake*), a été associé à la virulence de plusieurs membres des *Enterobacteriaceae* (Schubert *et al.*, 2002). De plus, Hancock et ses collaborateurs ont récemment démontré que ce récepteur de la yersiniabactine est important pour la formation de biofilms par une souche d'*E. coli* uropathogène (Hancock *et al.*, 2008). Ce sidérophore aurait donc possiblement un rôle dans le développement des ITUs.

1.2.3.3.5 Iha

Iha fut tout d'abord décrit comme étant une adhésine chez une souche d'*E. coli* entérohémorragique O157:H7 et a été nommé « *IrgA homologue adhesin* » en raison de son homologie avec le récepteur de l'entérobactine chez *Vibrio cholerae* (Mey *et al.*, 2002) et son habilité à conférer une adhérence à des cellules épithéliales chez une souche non adhérente (Tarr *et al.*, 2000). De plus, Johnson et ses collaborateurs ont démontré que Iha constitue un facteur de virulence chez la souche UPEC CFT073, dans un modèle murin d'infection du tractus urinaire ascendante (Johnson *et al.*, 2005a). Finalement, Léveillé et ses collaborateurs ont démontré que Iha est utilisé par la souche UPEC UCB34 en tant que récepteur de sidérophores catécholates et comme molécule d'adhésion à des cellules uroépithéliales. De plus, ils ont démontré son importance au niveau de la virulence lors d'une ITU (Léveillé *et al.*, 2006).

Environ 37% à 55% des souches causant des ITUs et des infections extraintestinales possèdent ce gène (Johnson *et al.*, 2005a). De plus, chez les souches CGA (groupe clonal A multirésistant causant des ITUs), 92% à 100% des souches présentent le gène *iha* (Johnson *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2005b).

1.2.3.3.6 IreA

La découverte d'IreA fut possible grâce à une étude qui a mis en évidence l'expression plus élevée de certains gènes dans les fluides biologiques, tels l'urine et le sang. *ireA* possède beaucoup d'homologie avec des récepteurs de sidérophores tels IrgA (*V. cholerae*), Iha (*E. coli*) et Iron (*E. coli* et *S. enterica*). Russo et ses collaborateurs ont donc vérifié si ce gène était régulé par le fer et ont découvert que ce dernier était réprimé par ce métal (Russo *et al.*, 2001).

1.2.3.3.7 ChuA

En plus de systèmes capables de transporter les sidérophores, certaines souches UPEC possèdent un transporteur de l'hème. En effet, chez la souche UPEC CFT073, des séquences d'homologie ont été observées avec le gène *chuA* chez *S. dysenteriae* et *E. coli* O157:H7 (Torres et Payne, 1997). Torres et ses collaborateurs ont démontré que *chuA* chez la souche CFT073 possédait aussi la fonction de récepteur de l'hème, puisque la souche mutante ne poussait pas bien avec ce composé comme seule source de fer. Cependant, aucune importance au niveau de la virulence n'a été observée en absence de ChuA dans le modèle murin d'infection du tractus urinaire ascendante (Torres *et al.*, 2001).

1.2.3.4 Sérogroupes et sérotypes

Comme mentionné précédemment (section 1.1.2), le sérotype d'*E. coli* est caractérisé par des différences dans la composition antigénique des structures de surface (O, H et K). Le sérotype, pour sa part, correspond à l'antigène O seulement. Chez *E. coli*, les trois types d'antigènes sont utilisés afin de classer les différentes souches (O, H et K). Les sérogroupes les plus fréquemment associés aux ITUs sont O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25, O50 et O75. La colonisation vaginale de la femme par les sérogroupes O2, O4, O6 et O75 mène habituellement à une ITUs contrairement aux autres sérogroupes. Les souches de sérotype O16 sont associées spécifiquement aux ITUs fébriles. Dans le cas du sérotype O18, celui-ci est associé aux cas de bactériuries asymptomatiques chez les enfants. Les sérogroupes O8, O14, O25 et O83 sont associés aux souches UPEC causant des cystites chez les jeunes filles (Johnson, 1991).

1.2.3.5 Capsule

Les polysaccharides de la capsule sont des polymères linéaires constitués d'une répétition de sous-unité d'hydrates de carbone et peuvent présenter un acide aminé ou un lipide proéminent. La capsule se retrouve à la surface de la cellule, empêche la détection de l'antigène O et protège la cellule des mécanismes de défenses de l'hôte. Par exemple, elle peut jouer un rôle dans la résistance à la phagocytose. Certains types de capsule sont plus souvent associés aux ITUs, particulièrement aux pyélonéphrites : K1, K2, K3, K5, K12, K13, K20 et K51. Les types de capsules K1, K2, K3, K12 et K13 sont retrouvés chez 70% des souches causant des pyélonéphrites affectant les jeunes filles, tandis que les types K1 et K5 sont associés à 63% des souches causant des pyélonéphrites chez les femmes (Donnenberg et Welch, 1996; Johnson, 1991).

La capsule K1 est le type de capsule le plus retrouvé chez les souches UPEC et intestinales. Celle-ci est généralement associée aux cas de méningites. Cependant, elle peut aussi être associée à certaines ITUs. Elle est plus fréquemment retrouvée dans les cas de pyélonéphrites et ne semble pas particulièrement importante dans les cas de cystites et de bactériuries asymptomatiques (Johnson, 1991). *E. coli* peut exprimer quatre types de capsules différentes, de I à IV, et qui correspondent à différents sérotypes (Whitfield et Roberts, 1999). La plupart des souches ExPEC produisent une capsule faisant partie du groupe II et certaines ont été reconnues pour leur contribution aux infections (Russo *et al.*, 1996).

Finalement, une étude réalisée par Valle et ses collaborateurs a démontré que les polysaccharides provenant des capsules de groupe II, produites par la majorité des UPEC et autres souches ExPEC, sont libérées dans l'environnement bactérien. En effet, ces polysaccharides capsulaires sont composés de polymères polysaccharidiques de hauts poids moléculaires et chargés négativement. Les polysaccharides capsulaires de la souche UPEC CFT073 modulent l'adhésion bactérienne et empêchent la formation de biofilms par d'autres bactéries Gram-positif et Gram-négatif (Valle *et al.*, 2006).

1.2.3.6 Résistance au sérum

La plupart des bactéries sont détruites par le sérum grâce à l'activité lytique du complément. L'action du complément se réalise par un complexe de protéines qui forment un pore à l'intérieur de la membrane externe de la bactérie, appelé complexe d'attaque membranaire (MAC). Cet événement mène à la destruction de la paroi de peptidoglycane de la bactérie due à la digestion par le lysozyme. Ultiment, la bactérie est lysée (Johnson, 1991).

La résistance au sérum rencontrée chez les bactéries dépend de plusieurs facteurs et de la combinaison de ceux-ci : les LPS, les protéines à la surface de la membrane ainsi que la formation d'une capsule (Donnenberg et Welch, 1996). Les antigènes O retrouvés dans la composition des LPS n'empêcheraient pas l'activation du complément, mais causeraient l'activation de ce dernier loin des sites de la membrane qui sont sensibles à son action. Lors d'ITUs, les patients atteints de pyélonéphrites et de cystites sont plus fréquemment infectés par des souches UPEC résistantes au sérum que les patients atteints de bactériurie asymptomatique (Johnson, 1991).

1.2.3.7 Autotransporteurs

Les autotransporteurs constituent une famille de protéines sécrétées chez les bactéries Gram-négatif. Tout comme les fimbriae, les autotransporteurs peuvent présenter des propriétés adhésives. De plus, ils sont en mesure de remplir d'autres rôles, tels des toxines, des protéases, des invasines, des facteurs de résistance au sérum et des facteurs de motilité (Henderson et Nataro, 2001). Les autotransporteurs possèdent tous la même structure. Cependant, les fonctions de chacun peuvent différer au niveau de la virulence. Habituellement, les autotransporteurs sont constitués de trois domaines : le domaine N-terminal dirigeant le précurseur vers la membrane interne, le domaine passager conférant à la protéine sa fonction ainsi que le domaine C-terminal permettant la sécrétion de l'autotransporteur au travers de la membrane externe. De cette façon, ils sont en mesure d'effectuer leur propre sécrétion (Henderson *et al.*, 1998). Certains autotransporteurs sont plus spécifiquement associés aux souches UPEC comparativement aux souches d'*E. coli*

causant des infections intestinales. En effet, les souches causant des ITUs comprises dans les groupes B2 et D présentent plus fréquemment les autotransporteurs Vat (B2 = 97% des souches), Sat (B2 = 43%, D = 81% des souches) et Pic (B2 = 43%) (Restieri *et al.*, 2007).

1.2.3.7.1 Sat

L'autotransporteur Sat (*Secreted autotransporter toxin*) fait partie de la famille des autotransporteurs sérine protéase des Enterobacteriaceae (SPATE) et est retrouvé chez la souche UPEC CFT073. Celui-ci semble avoir un effet toxique sur les cellules du tractus urinaire *in vitro* (reins et vessie). Bien qu'il n'y ait aucune différence de colonisation dans un modèle murin tant au niveau des reins, de la vessie et de l'urine, la souche possédant Sat induit une forte réponse aux anticorps comparativement à la souche ayant perdu Sat (Guyer *et al.*, 2000). Ce même groupe a de plus démontré que cet autotransporteur, chez la souche uropathogène CFT073, consiste en une cytotoxine causant la formation de vacuoles chez les cellules de vessie et de reins en culture. Dans un modèle d'infection murin d'ITU, Sat induit la formation de vacuoles dans le cytoplasme des cellules hôtes et possiblement le relâchement des jonctions cellulaires. De plus, il cause des dommages au niveau de glomérules du rein et contribue donc à la pathogénèse des souches UPEC (Guyer *et al.*, 2002).

1.2.3.7.2 PicU

Un autre autotransporteur peut être retrouvé chez les souches UPEC et fait aussi partie des SPATEs : PicU, retrouvé aussi chez *Shigella flexneri* et les EAEC. Cependant, au contraire de Sat, PicU semble appartenir à une autre branche des SPATE, qui ne possède pas d'activité toxique (Parham *et al.*, 2004). Cette protéine est exprimée durant une ITU et semble être habituellement associée aux pyélonéphrites (Anderson *et al.*, 2004). Elle y jouerait un rôle grâce à son activité de mucinase, c'est-à-dire à sa capacité à dégrader la mucine. Aucune différence n'a cependant été remarquée entre les infections de type pyélonéphrites et cystites par le groupe de Parham, suggérant que PicU n'est pas impliqué dans la progression de l'infection (Parham *et al.*, 2004). Cependant, le groupe de Heimer a proposé que ce facteur de virulence était préférentiellement associé aux pyélonéphrites

et pas nécessairement associé avec les infections de type cystite (Heimer *et al.*, 2004). Son rôle reste donc encore incertain dans le développement d'une ITU.

1.2.3.7.3 Antigène 43

L'antigène 43 (Ag43) fut initialement caractérisé pour son habilité à conférer aux bactéries la capacité de s'autoaggréger, en favorisant les interactions entre bactéries. Ce phénomène est visible macroscopiquement, par la présence de floculation. Le nom *flu* fut donc donné au locus codant pour l'Ag43 (Diderichsen, 1980). La majorité des souches d'*E. coli* ont la capacité d'exprimer l'Ag43 et la présence du gène *flu* est très conservée chez les différentes souches. Malgré le fait que les souches *E. coli* K-12 ne possèdent en général qu'une seule copie du gène *flu*, plusieurs souches sauvages (EPEC, EHEC et UPEC) possèdent plusieurs copies de cet allèle (Klemm *et al.*, 2004). On retrouve environ 50 000 copies de la protéine Ag43 par cellule (Owen, 1992). La fonction biologique de l'Ag43 est quelque peu controversée. En effet, cet antigène ne confère par de propriétés d'adhésion aux cellules des mammifères. Cependant, l'Ag43 possède d'autres fonctions telles l'autoaggrégation et l'aide à la formation de biofilms (Klemm *et al.*, 2004). De plus, il a été démontré chez la souche UPEC CFT073, où l'on retrouve deux allèles codant pour l'Ag43, que l'un de ces allèles (Ag43a), tout en promouvant l'autoaggrégation et la formation de biofilms, aide à la persistance à long terme dans la vessie (Ulett *et al.*, 2007). Aussi, des bactéries exprimant l'Ag43 survivent mieux suite à la phagocytose par les neutrophiles que des bactéries ne présentant pas l'antigène 43 (Fexby *et al.*, 2007).

1.2.3.8 Formation de biofilms

La récurrence d'une ITU se produit chez 27% à 44% des femmes qui ont développé une première infection, et ce dans les six mois suivants l'infection initiale et malgré le traitement par antibiotiques. La bactérie associée avec l'infection récurrente possède fréquemment un phénotype ou un génotype identique à la souche initiale (Anderson *et al.*, 2004). Ce phénomène serait sans doute dû à l'établissement de communautés bactériennes intracellulaires (IBCs). En effet, les bactéries causant des ITUs seraient en mesure, dans le stade précoce de l'infection, d'envahir les cellules superficielles du tractus urinaire et par la suite de se multiplier rapidement. Au fur et à mesure de la

croissance de la bactérie, de grands changements phénotypiques sont observables dans la cellule, menant à l'établissement d'IBCs. Les IBCs passent par plusieurs stades, menant ultimement à la formation de communautés ressemblant à des biofilms dans les cellules superficielles. Éventuellement, des bactéries se détachent du biofilm et se retrouvent à nouveau libres dans la vessie. Celles-ci sont alors en mesure de s'attacher à l'épithélium et initier un nouveau cycle de formation d'IBCs, provoquant ainsi les infections récurrentes et la persistance dans le tractus urinaire (Figure 1.2) (Anderson *et al.*, 2004). Les biofilms bactériens sont fréquemment associés avec la persistance à long terme des microorganismes dans divers environnements. Les bactéries vivant en biofilms présentent une résistance accrue aux antibiotiques, ce qui pourrait expliquer les difficultés rencontrées dans l'élimination des ces infections récurrentes (Donlan et Costerton, 2002).

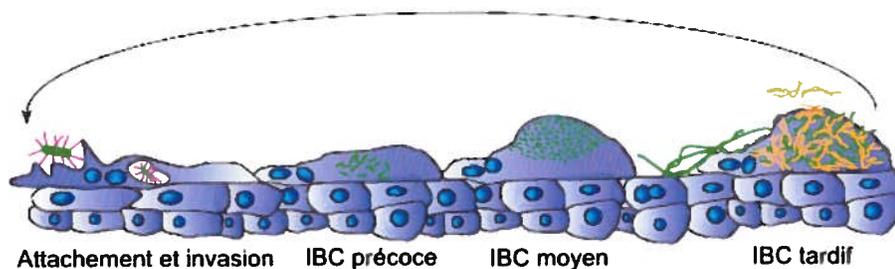


Figure 1.2 : Représentation schématique de la maturation des IBCs chez une souche UPEC. Peu de temps après l'infection de l'hôte, la bactérie UPEC (vert) se lie et envahit les cellules épithéliales de la vessie à l'aide du fimbriae de type 1 (rouge). La multiplication rapide mène à la formation d'un amas non organisé de bactéries, appelé IBC précoce. Suite à la maturation, les bactéries forment un IBC moyen. Éventuellement, les bactéries de se détachent du biofilm intracellulaire, deviennent motiles (flagelles jaunes) et se retrouvent libres dans la vessie. Le cycle peut se répéter, causant des épisodes de récurrences (Justice *et al.*, 2004).

Les souches UPEC sont de plus en mesure de former des biofilms sur les cathéters. En effet, un corps étranger, tel un cathéter, connecte un site habituellement stérile au monde extérieur et deviendra inévitablement coloniser par des microorganismes (Denstedt *et al.*, 1998). Les ITUs représentent l'infection la plus commune chez les patients ayant un cathéter (Foxman, 2002). Des biofilms bactériens sont observés sur pratiquement tous les implants artificiels se trouvant dans le tractus urinaire, menant fréquemment à des infections chroniques (Warren, 2001). De plus, plusieurs infections chroniques et persistantes, dont les ITUs, sont maintenant associées aux biofilms (Costerton *et al.*, 1999).

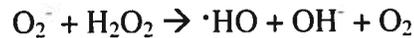
1.3 Importance du fer

Le fer représente un des éléments le plus abondant de la croûte terrestre. La plupart des organismes possèdent des enzymes utilisant ce cofacteur afin de réaliser plusieurs fonctions biologiques essentielles. En effet, le fer joue un rôle important dans le transport des électrons, le métabolisme, la protection contre le stress oxydatif, le métabolisme de l'ADN et la régulation de l'expression des gènes. Il est devenu essentiel pour la vie de la plupart des formes existantes sur Terre. Celui-ci est cependant incorporé aux protéines afin d'assurer sa stabilité et son potentiel de réduction adéquat. Le fer peut être retrouvé sous deux formes prédominantes : le fer ferreux (Fe^{2+}) ou le fer ferrique (Fe^{3+}). Le fer ferreux se retrouve sous forme soluble dans des conditions physiologiques tandis que le fer ferrique est plutôt insoluble dans certaines conditions (10^{-18} M à pH 7,0). Cette insolubilité peut mener à des problèmes d'approvisionnement en fer (Andrews *et al.*, 2003). De plus, le fer devient extrêmement toxique en présence d'oxygène, dû à la formation de radicaux (Braun et Braun, 2002).

Cette toxicité est due à l'interaction du fer avec certaines formes réactives de l'oxygène, telles l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces deux formes de l'oxygène ne sont normalement pas très réactives de façon physiologique. En effet, elles sont produites par les voies métaboliques normales de plusieurs systèmes biologiques. Cependant, suite à une interaction avec le fer, des espèces hautement réactives sont générées et peuvent causer de grands dommages à la cellule. La rencontre du H_2O_2 et du fer ferreux soluble Fe^{2+} produit spontanément un radical hydroxyle ($\text{OH}\cdot$) et l'oxydation du Fe^{2+} en Fe^{3+} . Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Fenton et s'écrit comme suit :



Une autre réaction est possible si le O_2^- et le H_2O_2 se rencontrent, ce qui produit un radical $OH\cdot$. Cette réaction est connue sous le nom de réaction de Haber-Weiss et est catalysée par le fer. Elle s'écrit comme suit :



Le radical hydroxyle $OH\cdot$ est le plus toxique. En effet, il réagit fortement avec plusieurs molécules organiques cellulaires. Par exemple, il est en mesure de causer des dommages aux membranes des cellules et à l'ADN de celles-ci. Pour cette raison, les différents organismes, tant l'humain que les bactéries, ont développé différents mécanismes de régulation de la quantité de fer présent, afin d'assurer un équilibre. De plus, plusieurs systèmes permettant de lier ou de capter le fer ont été développés afin d'assurer sa disponibilité pour l'utilisation en tant que cofacteur de plusieurs enzymes. Aussi, l'association du fer à différentes protéines permet de limiter sa réactivité. En effet, le fer libre est en mesure de générer des radicaux libres causant un stress oxydatif. Bref, ce phénomène empêche le Fe^{2+} de rencontrer le H_2O_2 et former le radical hydroxyle, mais aussi empêche la transformation du Fe^{2+} en Fe^{3+} , qui est insoluble et plus difficilement utilisable.

1.3.1 Protéines liant le fer chez l'humain

Lors d'une infection, le fer est important tant pour la bactérie que pour l'hôte. Comme mentionné plus haut, le fer est fréquemment utilisé comme cofacteur chez plusieurs enzymes essentielles impliquées dans les fonctions de base de la cellule ainsi que dans les réactions métaboliques (Andrews *et al.*, 2003; Schaible et Kaufmann, 2004). À l'instar de la bactérie, le fer retrouvé chez l'hôte infecté est lié à des protéines spécifiques telles la transferrine, la lactoferrine et la ferritine. De plus, le sidérocaldin est capable de lier le sidérophore bactérien, l'entérobactine, ce qui empêche la bactérie d'utiliser ce dernier. Finalement, le fer est complexé à l'hème et à l'hémoglobine (Schaible et Kaufmann, 2004).

La famille des transferrines constitue une famille regroupant des protéines très répandues chez les vertébrés. Celles-ci consistent en des glycoprotéines formées d'une seule chaîne possédant un poids moléculaire de 80 kDa. Cette famille rassemble trois protéines, soit la transferrine, la lactoferrine, retrouvée dans plusieurs fluides extracellulaires, et l'ovotransferrine, retrouvée dans l'albumen des œufs d'oiseaux. Les trois sont constituées de structures similaires qui fournissent le fer à une variété de cellules. Ces cellules l'incorporent par la suite dans leurs protéines. Elles servent à capter le fer libre en cas de surplus de fer dans le sang ou les autres fluides du corps lors de l'infection (Ratledge et Dover, 2000).

La ferritine est retrouvée chez un grand nombre d'organismes, non seulement chez les animaux, mais aussi chez les plantes et les microorganismes (Harrison et Arosio, 1996; Ratledge et Dover, 2000). Elle est constituée de 24 sous-unités s'assemblant afin de former une sphère capable de séquestrer le fer en très grande quantité, c'est-à-dire plus de 4000 atomes de Fe^{3+} (Arosio et Levi, 2002; Hentze *et al.*, 2004; Ratledge et Dover, 2000). Chez les bactéries, il existe une protéine similaire à la ferritine, la bactoferritine. Celle-ci possède un hème mais sa fonction est identique à la ferritine (Andrews *et al.*, 2003).

Le sidéocalin ou NGAL (neutrophil-gelatinase-associated lipocalin) est une petite protéine (25 kDa) faisant partie du système immunitaire inné. Elle est sécrétée par les cellules épithéliales lors des stades précoces d'inflammation. Cette protéine est emmagasinée à l'intérieur de granules spécifiques des neutrophiles et est relâchée lorsque ces derniers sont activés (Valdebenito *et al.*, 2007). Il a de plus été démontré que le sidéocalin est en mesure de se lier à l'entérobactine, un sidérophore sécrété par certaines bactéries (section 1.2.3.3.2) (Goetz *et al.*, 2002). Donc, le sidéocalin permettrait d'empêcher une bactérie retrouvée dans le corps d'acquérir le fer nécessaire à sa survie (Valdebenito *et al.*, 2007).

D'autres protéines du corps humain peuvent aussi diminuer la concentration en fer libre, telles l'hème et l'hémoglobine. Ces protéines, plutôt que de simplement séquestrer le fer, ont aussi besoin de ce dernier afin d'accomplir leurs fonctions biologiques.

Toutes ces protéines présentes chez l'hôte permettent de diminuer la concentration de fer libre disponible (Ratledge et Dover, 2000). Cependant, la concentration de fer par cellule bactérienne a été évaluée à environ 10^5 à 10^6 atomes. Pour arriver à ce résultat, les cellules devraient se retrouver dans un milieu contenant 10^{-7} à 10^{-5} M de fer, mais celui-ci en contient seulement 10^{-18} M (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000). Ainsi, lors d'une infection bactérienne, la quantité de fer disponible pour la bactérie est nettement insuffisante pour sa survie et sa croissance. Pour cette raison, les bactéries ont développées plusieurs moyens d'acquérir le fer nécessaire à leur survie. Par exemple, l'utilisation de sidérophores, tels l'entérobactine (section 1.2.3.3.2), les salmochelines (1.2.3.3.3) et la yersiniabactine (section 1.2.3.3.4) et d'autres systèmes d'acquisition du fer tels Iha (1.2.3.3.5), IreA (1.2.3.3.6), et ChuA (section 1.2.3.3.7).

1.3.2 Acquisition du fer chez les bactéries

Plusieurs mécanismes ont été mis en place par les bactéries afin de s'assurer qu'elles ont accès au fer nécessaire à leur survie et leur prolifération : l'acquisition de fer par les sidérophores, le transport du Fe^{2+} et réduction du Fe^{3+} en Fe^{2+} , le transport de type ABC et l'acquisition du fer des protéines de l'hôte directement (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000).

Tout d'abord, l'acquisition de fer peut être réalisée par l'entremise des sidérophores. Les sidérophores sont de petites molécules de faible poids moléculaire (<1000 Da) qui sont libérées lorsque la bactérie subit une déficience en fer. Elles possèdent une grande spécificité pour le fer ferrique (Fe^{3+}) (Andrews *et al.*, 2003). Le nombre de sidérophores produits par différentes souches bactériennes, levures, moisissures et plantes est supérieur à 500 (Andrews *et al.*, 2003; Ratledge et Dover, 2000). Les sidérophores peuvent atteindre une très grande concentration dans le milieu environnant. Par exemple, l'aérobactine produite par certaines souches d'*E. coli* peut être produite à une concentration allant jusqu'à 200 mg/l (section 1.2.3.3.1) (Andrews *et al.*, 2003). D'autres exemples de sidérophores chez *E. coli* sont l'entérobactine (section 1.2.3.3.2), les salmochelines (section 1.2.3.3.3) et la yersiniabactine (section 1.2.3.3.4).

Un autre moyen pour les bactéries d'acquérir du fer est la réduction du fer ferrique en fer ferreux et le transport du fer ferreux. Chez *E. coli*, le transporteur Feo peut accomplir ce transport de fer ferreux. Deux gènes codent pour ce dernier, *feoAB*. Ceux-ci sont induits lorsque la bactérie rencontre des conditions anaérobiques et ils sont réprimés par la présence de fer. Ce type de transport semble être important lorsque la quantité de fer ferreux est stable et prédominante sur le fer ferrique (Andrews *et al.*, 2003). De plus, plusieurs réductases de fer ferrique extracellulaires ont été découvertes chez différentes souches bactériennes, ce qui permettrait de favoriser ce type de transport (Cowart, 2002).

Le transport du fer par des transporteurs de type ABC (comportant une *ATP-Binding Cassette*) est une autre stratégie que les bactéries ont développée afin d'obtenir le fer dont elles ont besoin. Plusieurs transporteurs de ce type ont été découverts, incluant SfuABC, SitABCD, YfeABCD, FbpABC ainsi que FutABC retrouvés chez les souches bactériennes *Serratia marcescens*, *Salmonella Typhimurium*, *Yersinia pestis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Synechocystis* PCC 6803 (Bearden et Perry, 1999; Janakiraman et Slauch, 2000; Robinson *et al.*, 1999). Certains de ces systèmes sont retrouvés chez des souches d'*E. coli* pathogènes. Le système SitABCD, dont il sera traité plus en détails dans une autre section (section 1.4.1.1), semble cependant avoir une affinité plus importante pour le manganèse que pour le fer contrairement aux conclusions qui avaient été avancées suite à sa découverte (Andrews *et al.*, 2003).

Finalement, l'acquisition du fer directement des protéines de l'hôte est une autre stratégie employée par les bactéries. Par exemple, chez *Neisseria* spp., le fer ferrique est retiré de la transferrine et de la lactotransferrine au niveau de la membrane externe. Par la suite, celui-ci est transporté à l'intérieur de la bactérie par les systèmes TbpAB et FbpABC (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003; Ratledge et Dover, 2000). *Yersinia pestis* peut utiliser l'hème comme seule source de fer pour sa prolifération. En effet, cette bactérie, responsable de la peste bubonique, possède deux systèmes de transport de l'hème (Hmu et Has) (Rossi *et al.*, 2001). *Haemophilus influenzae* peut utiliser l'hémoglobine, l'hémoglobine-haptoglobine, l'hème-hexopexine et l'hème albumine (Litwin et Calderwood, 1993). Cependant, l'hème et l'hémoglobine doivent être relâchés des

érythrocytes avant de pouvoir être disponibles pour les bactéries. Pour arriver à cette fin, plusieurs souches bactériennes possèdent des hémolysines et des protéases capables de lyser les cellules. Par la suite, l'hème et l'hémoglobine peuvent être complexés à d'autres protéines de l'hôte telles l'haptoglobine, l'hémopexine ainsi que l'albumine (Litwin et Calderwood, 1993). Finalement, les souches *E. coli* EDL933 (O157:H7) ainsi que la souche UPEC CFT073 sont en mesure d'utiliser l'hème à l'aide du gène *chuA* (Torres et Payne, 1997; Torres *et al.*, 2001).

1.3.3 Régulation du transport du fer

Étant donné la toxicité possible du fer (section 1.3), les bactéries ont développé différents mécanismes de régulation ayant pour but de les protéger de cette toxicité. Chez *E. coli*, cette régulation est réalisée à l'aide de la protéine Fur (*Ferric-uptake regulator*). Cette protéine contrôle l'expression de plus de 90 gènes impliqués dans le transport du fer (Andrews *et al.*, 2003). La protéine Fur est composée de deux domaines : le domaine N-terminal et le domaine C-terminal. Le domaine N-terminal constitue le domaine se liant à l'ADN. Le domaine C-terminal, riche en résidus histidines, contient deux sites pouvant lier le Fe^{2+} et est important pour la dimérisation de la protéine (Andrews *et al.*, 2003; Hantke, 2001). Fur agit en tant que répresseur positif, c'est-à-dire qu'il supprime la transcription lors de son interaction avec son co-répresseur, le Fe^{2+} . En absence de Fe^{2+} , il n'y a pas de répression. Certaines études ont suggéré que le site de liaison du Fe^{2+} pourrait aussi lier le Co^{2+} , le Mn^{2+} ou d'autres cations divalents *in vitro*. Cependant, ces métaux sont présents en quantité insuffisante *in vivo* pour interagir avec Fur. La liaison de Fe^{2+} à Fur augmente d'environ 1000 fois l'affinité de Fur pour les séquences d'ADN spécifiques auxquelles il se fixe. De plus, la protéine Fur contient au moins un ion de zinc structural par dimère au niveau du domaine C-terminal (Andrews *et al.*, 2003; Hantke, 2001).

En tant que régulateur, la protéine Fur doit se fixer à l'ADN afin de réprimer les gènes nécessaires. La protéine, formant un complexe avec le Fe^{2+} , se lie normalement entre les sites -35 et -10 du promoteur du gène régulé. On appelle cette région la boîte Fur, et elle

est constituée d'une séquence consensus conservée. Une première séquence avait été suggérée et est présentée à la figure 1.3 (de Lorenzo *et al.*, 1987; Stojiljkovic *et al.*, 1994).

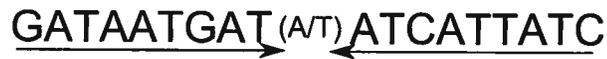


Figure 1.3 : Configuration de la première boîte Fur élucidée (de Lorenzo *et al.*, 1987).

Cependant, cette séquence exacte n'est pas retrouvée dans le génome d'*E. coli*. De plus, des études utilisant la DNaseI (Désoxyribonucléase 1) ont permis de démontrer que Fur protège une région plus large que la région suggérée par la boîte Fur, c'est-à-dire d'environ 31 paires de base (pb). De plus, il arrive fréquemment que l'on retrouve plusieurs sites de liaison de Fur les uns à côtés des autres pour la régulation d'un même gène, suggérant que plusieurs dimères de Fur peuvent se lier (Andrews *et al.*, 2003). Toutes ces découvertes ont mené à la construction d'une nouvelle séquence consensus pour la boîte Fur, présentée à la figure 1.4 (Lavrrar *et al.*, 2002).



Figure 1.4 : Configuration de la boîte Fur réarrangée (Lavrrar *et al.*, 2002).

Cet arrangement permet à deux dimères formés des protéines Fur de se lier à chacune des boîtes Fur.

La protéine Fur est très abondante dans chaque cellule d'*E. coli* durant la phase exponentielle de croissance de celle-ci, comptant environ 5000 copies par cellule. Dans la phase stationnaire, le nombre de protéine Fur peut aller jusqu'à 10000 copies par cellule (Zheng *et al.*, 1999). Il a de plus été suggéré que Fur servirait de tampon, puisqu'il serait en mesure de lier le Fe²⁺ libre dans la cellule avec une affinité d'environ 10 μM (Bagg et Neilands, 1987), ce qui correspond au niveau de fer ferreux libre retrouvé dans la cellule (Keyer et Imlay, 1996).

Plusieurs gènes sont régulés par Fur. On retrouve par exemple les gènes *entABCDEF* (synthèse de l'entérobactine), *entS* (sécrétion de l'entérobactine), *fepBCDEG* (transport du complexe ferri-entérobactine), *fepA* (transport du complexe ferri-entérobactine), *fes* (utilisation du complexe ferri-entérobactine), *fhuABCD* (transport d'hydroxamate ferrique) et le gène *fur* lui-même. Tous ces gènes sont impliqués dans le transport du fer dans la cellule. Étant donné que la fonction principale de Fur est de réprimer l'acquisition de fer lorsque celui-ci se retrouve en quantité suffisante, il est impliqué dans leur régulation. Cependant, Fur est aussi impliqué dans la régulation de gène n'ayant aucune fonction connue en lien avec le fer. Par exemple, les gènes *cyoA* (sous-unité terminale de l'oxydase respiratoire), *flbB* (impliqué dans la motilité), *gpmA* (impliqué dans la glycolyse) et *metH* (impliqué dans la synthèse de méthionine) sont régulés par la protéine Fur. Certains gènes sont aussi induits par Fur, bien que cette induction ne soit pas effectuée à l'aide de la fixation à la boîte Fur. Par exemple, les gènes *acnA*, *bfr*, *ftnA*, *fumA* et *fumB* consistent en des gènes impliqués dans l'entreposage du fer, ou en des protéines possédant un centre fer-soufre (Fe-S), donc utilisant le fer (Andrews *et al.*, 2003).

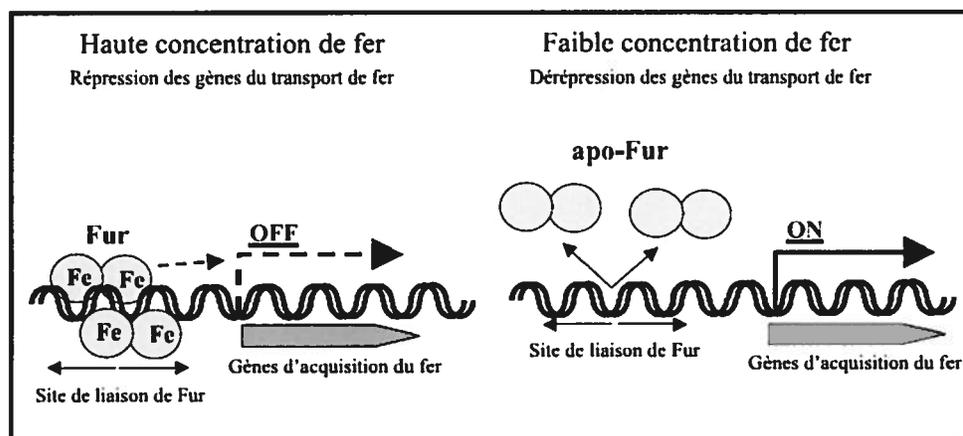


Figure 1.5 : Mécanisme de régulation de *fur* (Andrews *et al.*, 2003).

Le mécanisme de cette régulation positive a été tout récemment élucidé. En effet, Fur réprime un petit ARN (ARNs), RyhB, composé de 90 nucléotides. Ce dernier facilite la dégradation des ARN messagers (ARNm) des gènes régulés positivement par Fur. Comme illustré sur la figure 1.6, en présence de fer, Fur est actif et réprime la

transcription de *ryhB*. Celui-ci ne peut donc pas dégrader les ARNm des gènes d'entreposage du fer, et ceux-ci sont donc exprimés. Par contre, en absence de fer, Fur est inactif et ne réprime pas la transcription de *ryhB*. Celui-ci est donc en mesure de dégrader les ARNm des gènes d'entreposage du fer (Masse *et al.*, 2007).

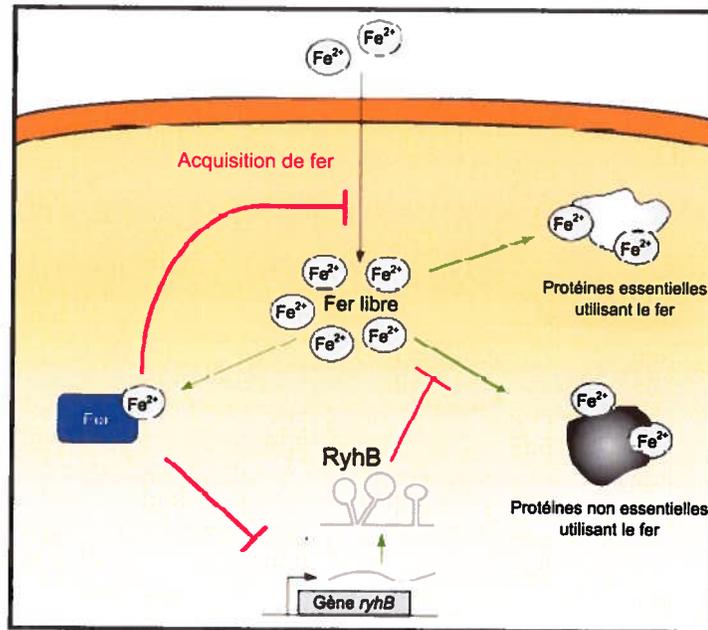
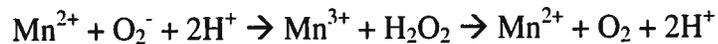


Figure 1.6 : Mécanisme de régulation du fer nouvellement acquis par RyhB et Fur. Suite à l'acquisition et l'entrée de fer dans la cellule, ce dernier se retrouve temporairement libre dans le cytoplasme avant d'être incorporé à des protéines essentielles et non essentielles utilisant le fer. Dans des conditions où le niveau de fer libre augmente, Fur devient activé et réduit l'expression des gènes d'acquisition du fer. À l'opposé, lorsque le niveau de fer est faible, Fur est inactif, ce qui induit l'expression des gènes d'acquisition du fer et *ryhB*. Par la suite, RyhB bloque rapidement la synthèse des protéines non essentielles utilisant le fer (Masse *et al.*, 2007).

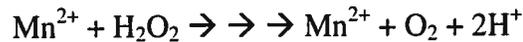
Le fer est un important cofacteur pour plusieurs enzymes et est impliqué à plusieurs niveaux dans la cellule. Cependant, d'autres métaux sont essentiels à la survie cellulaire. Le manganèse fait partie de ces derniers et sera abordé dans la section suivante.

1.4 Importance du manganèse

Bien que le manganèse soit considéré comme un élément trace essentiel, peu d'importance lui est généralement accordée dans la physiologie cellulaire des bactéries. Comme le fer, on le retrouve sous deux états d'oxydation, le Mn^{2+} et le Mn^{3+} (Kehres et Maguire, 2003). Il semble être utilisé sous sa forme Mn^{2+} par les systèmes biologiques (Papp-Wallace et Maguire, 2006). Communément, le manganèse est reconnu pour jouer le rôle de cofacteur d'enzymes utilisées dans la détoxification des radicaux libres (Kehres et Maguire, 2003). En effet, des expériences *in vitro* ont démontré que le Mn^{2+} peut agir afin de détoxifier l'ion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Dans le cas de l'ion O_2^- , le Mn^{2+} joue le rôle de catalyseur et la réaction s'écrit comme suit (Horsburgh *et al.*, 2002).



Dans le cas du H_2O_2 , le Mn^{2+} joue aussi le rôle de catalyseur et la réaction est présentée ci-dessous (Horsburgh *et al.*, 2002).



Le mécanisme exact de détoxification du H_2O_2 n'est pas clair et il semble impliquer des étapes intermédiaires encore inconnues indiquées par les flèches.

Une similarité importante entre le Mn^{2+} et le Fe^{2+} est le fait que leurs potentiels réducteurs sont assez similaires pour les composés biologiques. La principale différence réside dans le fait que le Mn^{2+} libre dans un environnement biologique n'est pas toxique, au contraire du Fe^{2+} , qui, comme mentionné précédemment, génère des radicaux libres (section 1.3) (Kehres et Maguire, 2003).

1.4.1 Acquisition de manganèse chez les bactéries

Jusqu'à ce jour, deux classes majeures de transporteurs de Mn^{2+} ont été caractérisées chez les bactéries : les transporteurs de Mn^{2+} de type Nramp (*Natural resistance-associated macrophage protein*) et les perméases de Mn^{2+} de type ABC (Papp-Wallace et Maguire, 2006).

La famille des transporteurs membranaires de métaux Nramp a tout d'abord été découverte chez les plantes, les animaux et les levures (Cellier *et al.*, 1996). La protéine Nramp1 est exprimée dans les lysosomes des macrophages et est recrutée au niveau de la membrane des phagosomes contenant des microbes (Gruenheid et Gros, 2000), où elle retire certains métaux tel le Mn^{2+} (Jabado *et al.*, 2000). La protéine Nramp2 est responsable du transport de fer au niveau de l'intestin chez les mammifères (Gunshin *et al.*, 1997) et est aussi impliquée dans le transport de la transferrine chez plusieurs types cellulaires (Rolfes et Hediger, 1999). Donc, les protéines Nramp1 et Nramp2 retrouvées chez les mammifères constituent des transporteurs de métaux divalents dépendant des protons, avec des affinité pour le Mn^{2+} , le Fe^{2+} et le Zn^{2+} (Papp-Wallace et Maguire, 2006). Des homologues Nramp ont maintenant été retrouvés chez plusieurs genres bactériens, tels *B. subtilis*, *Salmonella Typhimurium* et *E. coli*, où ils sont appelés MntH (*Proton-dependent manganese transporter*) (Cellier *et al.*, 2001; Papp-Wallace et Maguire, 2006). Ces transporteurs sont habituellement constitués d'environ 450 acides aminés chez les bactéries et possèdent 10 à 12 domaines transmembranaires. Dans le cas d'*E. coli*, ces domaines transmembranaires se dénombrent à 11 (Courville *et al.*, 2004).

Les perméases de Mn^{2+} de type ABC ont tout d'abord été découvertes chez les bactéries Gram-positif, en tant que protéines d'adhésion faisant partie de la famille des LraI (*lipoprotein receptor-associated antigen I*). Par la suite, des études ont démontrées qu'elles pouvaient aussi fonctionner en tant que transporteurs de haute affinité de Mn^{2+} . Chaque transporteur est constitué d'une lipoprotéine ancrée dans la membrane extracellulaire, d'une protéine cytoplasmique liant l'ATP et d'une protéine membranaire qui est responsable de l'efflux des cations. Chez les bactéries Gram-négatif, le même type

de transporteurs est retrouvé, mais la lipoprotéine membranaire est remplacée par une protéine périplasmique liant les cations. La plupart de ces transporteurs montrent une préférence pour le Mn^{2+} (Papp-Wallace et Maguire, 2006). Parmi ceux-ci se retrouve le transporteur SitABCD.

1.4.1.1 Transporteur SitABCD et MntH

Le transporteur SitABCD a tout d'abord été décrit chez la souche *S. Typhimurium* en 1999 par Zhou et ses collaborateurs (Zhou *et al.*, 1999). Celui-ci est composé de quatre gènes qui encodent des polypeptides partageant beaucoup d'homologie avec le système YfeABC, un transporteur de fer de type ABC chez *Yersinia pestis*. Le gène *sitA* code pour une protéine de liaison périplasmique, le gène *sitB* code pour une protéine liant l'ATP et les gènes *sitC* et *sitD* codent pour des perméases présentes dans la membrane interne (Figure 1.7) (Zhou *et al.*, 1999). Il constitue donc un transporteur de type ABC, qui est en mesure de transporter le Fe^{2+} ainsi que le Mn^{2+} . De plus, son affinité pour le Fe^{2+} est légèrement plus élevée que l'affinité de MntH (Janakiraman et Slauch, 2000; Kehres *et al.*, 2002b; Sabri *et al.*, 2006). Chez *E. coli*, il semblerait que ce système est retrouvé surtout dans les groupes phylogénétiques A, B2 et D. Il serait donc associé majoritairement aux souches ExPEC (Sabri *et al.*, 2008).

Il a de plus été découvert, chez *S. Typhimurium*, que SitABCD constitue le transporteur de Mn^{2+} utilisé en milieu modérément alcalin, tandis que MntH serait plus efficace en milieu modérément acide, dû au gradient de protons essentiel à son fonctionnement (Kehres *et al.*, 2002b). Le rôle de SitABCD et MntH dans la virulence de cette même souche semble être important, comme l'ont démontré Zaharik et ses collaborateurs. En effet, ils ont démontré que *S. Typhimurium* avait besoin des deux systèmes, MntH et SitABCD, pour une virulence complète chez des souris n'ayant pas un locus Nramp fonctionnel suivant une infection intrapéritonéale (Zaharik *et al.*, 2004). De plus, Boyer et ses collaborateurs ont démontré dans un modèle d'infection intraveineuse chez des souris Nramp négative que le simple mutant $\Delta mntH$ n'était pas affecté au niveau de sa virulence, au contraire du simple mutant $\Delta sitABCD$, chez lequel une légère baisse de virulence a été

observée. Pour sa part, le double mutant $\Delta mntH\Delta sitABCD$ était complètement atténué. Ces résultats ont suggéré une importance pour la virulence de la souche du système SitABCD, ainsi que la redondance partielle des systèmes MntH et SitABCD (Boyer *et al.*, 2002). Le gène *sitA* est aussi induit lorsque la bactérie se retrouve dans une lignée de macrophage (Janakiraman et Slauch, 2000). Chez *S. Typhimurium*, on retrouve des sites de liaison pour les deux régulateurs Fur et MntR (Ikeda *et al.*, 2005; Kehres *et al.*, 2002a; Kehres *et al.*, 2002b; Zhou *et al.*, 1999). MntR est plus efficace lorsqu'il utilise le manganèse mais peut aussi utiliser le fer comme cofacteur. Fur est plus efficace lorsqu'il utilise le fer mais peut aussi utiliser le manganèse comme cofacteur (Ikeda *et al.*, 2005).

Plusieurs études ont aussi été effectuées chez *Shigella flexneri*, qui possède aussi le système SitABCD. Il a tout d'abord été découvert que le gène *sitA* était induit lorsque cette bactérie intracellulaire se retrouvait dans une cellule Henle (Runyen-Janecky et Payne, 2002). Par la suite, il a été démontré que ce système chez *S. flexneri* est aussi en mesure de transporter le fer et le manganèse. Il semblerait aussi que la transcription de *sitABCD* est réprimée par la présence de manganèse et de fer, suggérant une possible régulation par les protéines MntR et Fur, comme chez *S. Typhimurium* (Runyen-Janecky *et al.*, 2003). Plus récemment, une étude a été réalisée mettant en évidence les relations entre MntH et SitABCD chez cette souche. Les résultats présentés ont démontré que ces deux systèmes avaient un rôle redondant dans les situations où la bactérie doit survivre en présence de H_2O_2 . De plus, l'expression de l'opéron *sitABCD* n'était pas induite par la H_2O_2 (Runyen-Janecky *et al.*, 2006).

Le système SitABCD a aussi été étudié chez une souche aviaire d'*E. coli* (APEC), $\chi 7122$. Chez cette souche, l'opéron *sitABCD* est contenu sur le plasmide de type colicine V, pAPEC-1. Il a de plus été démontré que ce système était en mesure de transporter le manganèse ainsi que le fer. La résistance au stress oxydatif causé par le H_2O_2 peut être assumée autant par SitABCD que par MntH, suggérant que l'un des deux systèmes est en mesure d'assurer le transport de manganèse nécessaire à la cellule. Ces résultats suggèrent aussi un rôle combiné entre les deux systèmes (Sabri *et al.*, 2006). Dans le cadre d'une autre étude utilisant cette même souche, il a été démontré que la perte de

SitABCD cause une baisse dans la virulence de la souche, particulièrement au niveau des poumons, de la rate et du foie. De plus, la perte des deux systèmes, SitABCD et MntH, rend la souche plus sensible à différents agents générant des ROS (Sabri *et al.*, 2008).

Une étude a aussi été effectuée chez la souche bactérienne *Sinorhizobium meliloti*, une bactérie établissant une relation symbiotique avec la plante *Medicago sativa* (luzerne). Après avoir muté le gène *sitA*, les auteurs ont découvert que la souche était plus sensible au H₂O₂ et qu'elle présentait un défaut au niveau de l'établissement de la symbiose (Davies et Walker, 2007b). Ils ont de plus démontré que chez *S. meliloti*, *sitA* est impliqué dans le transport de Mn²⁺ et qu'il est impliqué dans le bon établissement de la symbiose (Davies et Walker, 2007a).

MntH est un transporteur de haute affinité retrouvé chez *S. Typhimurium* ainsi que chez *E. coli* (Kehres *et al.*, 2000). Celui-ci présente une bonne homologie avec les protéines Nramp présentes chez les cellules eucaryotes. Il fait donc partie de la famille des transporteurs membranaires de métaux Nramp, avec 11 domaines transmembranaires (section 1.4.1) (Kehres *et al.*, 2002b). MntH transporte le Mn²⁺ avec une affinité d'environ 0,1 µM chez *S. Typhimurium* et d'environ 0,5 µM chez *E. coli* (Gerchman *et al.*, 1993). Il peut aussi transporter le Fe²⁺ mais seulement avec une affinité supérieure à 10 µM, ce qui est beaucoup plus élevé que les concentrations physiologiques de fer retrouvées. Il a donc été conclu que MntH transporte surtout du Mn²⁺. Ceci est confirmé par le fait qu'après être surexprimé chez *E. coli*, cette souche devient plus sensible au manganèse (Kehres *et al.*, 2000). Cependant, bien que son rôle semble très important chez *S. Typhimurium* et *E. coli*, des souches mutées pour ce gène ne démontrent pas de difficultés de croissance attribuable au manque de Mn²⁺. De plus, la virulence chez les souris n'est que partiellement diminuée en absence de *mntH*. Une des explications possibles est que la bactérie possède un autre système de transport de Mn²⁺ qui est en mesure de prendre la relève du système MntH, possiblement SitABCD. Chez une souche d'*E. coli* APEC, la perte de MntH ne diminue pas la virulence de la souche (Sabri *et al.*, 2008).

On retrouve, au niveau du promoteur de *mntH*, des boîtes de liaison pour la protéine OxyR ainsi que pour la protéine Fur (Kehres *et al.*, 2002b). De plus, une boîte de liaison pour MntR a été identifiée chez *E. coli* (Patzer et Hantke, 2001).

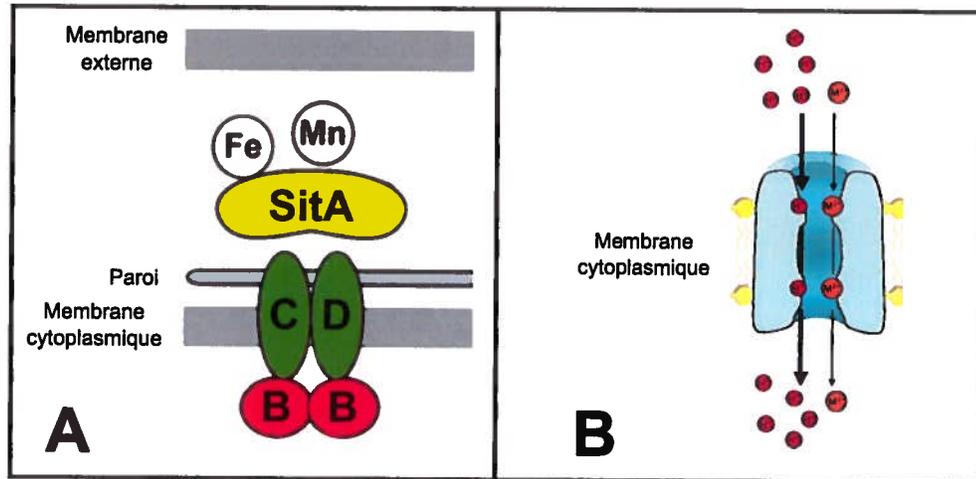


Figure 1.7 : Schéma comparatif des transporteurs SitABCD (Desrosiers *et al.*, 2007) et MntH (Nevo et Nelson, 2006). **A :** Schématisation du système de transport de métaux SitABCD. Ce dernier est un transporteur de type ABC, comprenant une protéine de liaison périplasmique (SitA), d'une protéine liant l'ATP (SitB) et de deux perméases (SitC et SitD). **B :** Schématisation du système de transport de métaux (M^{2+}) MntH. Ce dernier fait partie de la famille des transporteurs Nramp et est constitué de 11 domaines transmembranaires. Il fonctionne à l'aide d'un gradient de protons (H^+).

1.4.2 Régulation du transport de manganèse

Le transport de manganèse, tout comme le transport de fer, est régulé par différents mécanismes inhérents à la bactérie. Chez *E. coli*, deux protéines participent principalement à cette régulation : MntR et Fur (Kehres et Maguire, 2003; Papp-Wallace et Maguire, 2006).

La protéine MntR fait partie de la famille de régulateurs transcriptionnels DtxR. Ce régulateur répond presque exclusivement au Mn^{2+} . En présence de Mn^{2+} , celui-ci se lie au dimère de protéines MntR.

Ce dernier se lie par la suite à la boîte MntR, dont la séquence est présentée à la figure 1.8 (Patzer et Hantke, 2001).

AAACATAGC_{C_{TTT}}GCTATGTTT

Figure 1.8 : Configuration de la boîte MntR située sur les gènes sous son contrôle (Patzer et Hantke, 2001).

Dans le cas de la protéine Fur, il semble surprenant qu'elle soit en mesure de réguler le transport de Mn^{2+} , puisque les transporteurs de type MntH et les perméases de type ABC n'utilise généralement pas le Fe^{2+} comme substrat. Néanmoins, il a été démontré que l'ajout de fer dans un milieu de culture peut réprimer efficacement la transcription de *mntH* et *sitABCD* par l'entremise d'une boîte Fur distincte de la boîte MntR (Papp-Wallace et Maguire, 2006).

1.5 Stress oxydatif

Le stress oxydatif se définit comme une perturbation dans la balance prooxydant-antioxydant en faveur des prooxydants. Des conditions menant à une augmentation des espèces réactives de l'oxygène ou à une diminution des molécules antioxydantes constitue un stress oxydatif. En d'autres mots, le stress oxydatif est causé par des niveaux élevés d'anion superoxyde (O_2^-), de peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou de radical hydroxyle (OH^\bullet). Ces trois espèces réactives de l'oxygène (ROS) peuvent causer des dommages aux composants cellulaires, par exemple aux protéines, à l'ADN et aux membranes (Storz et Zheng, 2000). Cependant, elles sont naturellement produites par le métabolisme cellulaire et constituent donc un danger permanent pour les organismes vivants (Touati, 2000). Pour les bactéries aérobiques, c'est-à-dire qui croissent en présence d'oxygène, l'oxydation de composantes de la chaîne respiratoire est la source principale de O_2^- et de H_2O_2 . Les ROS peuvent aussi être produites suite à une exposition aux radiations, aux métaux ou à certains médicaments.

1.5.1 Stress oxydatif dans la défense de l'hôte

Les plantes, les microorganismes et les animaux possèdent tous des mécanismes visant à générer spécifiquement des substances oxydantes servant de défense aux invasions bactériennes (Storz et Zheng, 2000). Lors d'infections chez un hôte, le système immunitaire est activé. Par la suite, les macrophages acquièrent des activités microbicides et tumoricides qui impliquent des ROS et des métabolites réactifs de l'azote (Sasmono et Hume, 2004). Les neutrophiles aussi génèrent des ROS, tels le O_2^- se transformant par la suite en H_2O_2 , à l'intérieur des phagosomes lors de la phagocytose d'agent étranger. Ceux-ci sont impliqués dans le processus de destruction de l'intrus. En effet, le H_2O_2 généré peut ensuite réagir avec des ions de chlore et ainsi former de l'acide hypochloreux (HOCl) dans une réaction catalysée par la myéloperoxydase (MPO). Le HOCl est très toxique pour plusieurs microorganismes, mais n'est pas très stable. Cependant, ce dernier peut réagir avec des amines primaires et secondaires et ainsi former les N-chloramines, qui sont des agents antimicrobiens très stables. On retrouve donc un environnement très toxique (Kuijpers et Roos, 2004).

1.5.2 Substances chimiques causant du stress oxydatif

Plusieurs substances chimiques peuvent être utilisées afin de générer artificiellement un stress oxydatif. Par exemple, il est possible d'utiliser une solution de H_2O_2 . La plumbagine (5-hydroxy-2-méthyl-1,4-naphthoquinone) est aussi en mesure d'entrer dans la cellule et produit aussi du H_2O_2 et du O_2^- . Elle possède des activités antibactérienne, antifongique, anticancérigène ainsi que antimutagène. L'exposition à la phénazine méthosulfate produit une haute activité de la catalase et peu d'activité des SODs, alors que l'exposition à la plumbagine augmente l'activité des deux mécanismes de résistance au stress oxydatif (Hassan et Fridovich, 1979; Schwartz *et al.*, 1983)

Il a été suggéré que la plumbagine active SoxS par l'oxydation de la protéine SoxR (Chen *et al.*, 2006; Gaudu *et al.*, 1997). La phénazine méthosulfate et la phénazine éthosulfate sont toutes deux en mesure d'entrer dans la cellule et produisent du O_2^- .

1.5.3 Défenses bactériennes contre les ROS

Les bactéries ont cependant développé différents moyens de résister au stress oxydatif. Tout d'abord, on retrouve les enzymes de type superoxyde dismutase (SOD). Celles-ci sont retrouvées de façon ubiquitaire, suggérant que le O_2^- cause des problèmes pour tous les organismes aérobiques. Le rôle des SODs est de réduire la concentration de O_2^- à des concentrations tolérables pour la cellule (Keyer *et al.*, 1995). On retrouve plusieurs types de SODs, fonctionnant à l'aide de différents cofacteurs. Tout d'abord, il existe une SOD utilisant le Mn^{2+} en tant que cofacteur (*sodA*) (Keele *et al.*, 1970). *E. coli* possède aussi une SOD utilisant le Fe^{2+} comme cofacteur et qui est codée par le gène *sodB* (Yost et Fridovich, 1973). Certaines SODs retrouvées chez les eucaryotes utilisent aussi le zinc (Zn^{2+}). Certains procaryotes utilisent aussi le Zn/Cu (Rae *et al.*, 1999). Les SODs transforment le O_2^- en H_2O_2 , qui est par la suite transformé en H_2O par les catalases (Hassan, 1988).

Les catalases, aussi retrouvées chez la majorité des organismes utilisant l'oxygène, visent la détoxification d'un type de ROS, le H_2O_2 (Imlay, 2003). Celles-ci sont codées par les gènes *kat* et le cofacteur utilisé peut être le Fe^{2+} (KatG et KatE) ou le Mn^{2+} chez *S. Typhimurium* (catalase non-hème KatN) (Kehres et Maguire, 2003). Chez *E. coli*, deux isoenzymes de catalases (HPI et HPII) convertissent le H_2O_2 en oxygène et en eau (Loewen *et al.*, 1985). HPI est codée par *katG* et son expression est sous le contrôle de OxyR. HPII pour sa part est codée par les gènes *katE* et *katF* et ne fait pas partie du régulon d'OxyR au contraire de HPI (Schellhorn, 1995).

1.5.4 Régulation de la réponse au stress oxydatif

Deux systèmes sont impliqués dans la régulation de la réponse au stress oxydatif : OxyR et SoxRS. Ces deux régulateurs ont des fonctions différentes dans la réponse aux stress oxydatifs.

1.5.4.1 OxyR

OxyR constitue une protéine de 34 kDa qui partage plusieurs homologues avec la famille des régulateurs bactériens LysR et possède un domaine N-terminal hélice-boucle-hélice se liant à l'ADN (Christman *et al.*, 1989). L'activation de la transcription par OxyR se produit probablement grâce à l'interaction avec l'ARN polymérase. La protéine OxyR existe sous deux formes : oxydée ou réduite. C'est sous forme de tétramère oxydé seulement qu'OxyR est en mesure d'activer la transcription (Figure 1.9) (Pomposiello et Demple, 2001; Storz *et al.*, 1990).

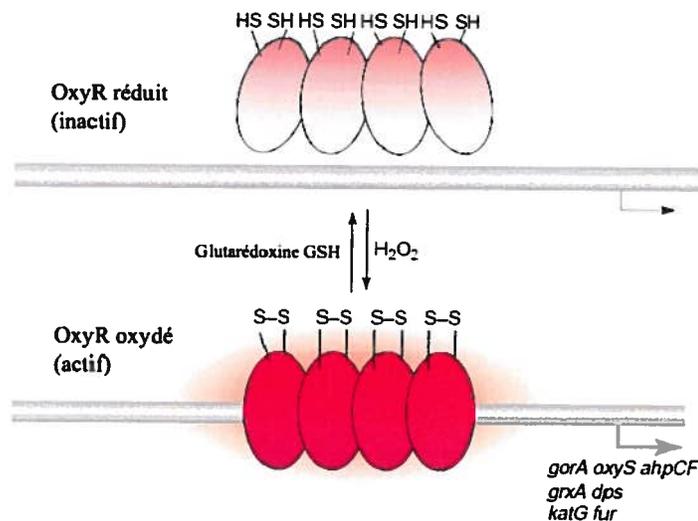


Figure 1.9 : Le régulon OxyR. La protéine OxyR est produite constitutivement et est oxydée par le H₂O₂. La forme oxydée se lie aux régions d'ADN et active la transcription grâce à des interactions protéines-protéines avec l'ARN polymérase (GSH = glutathion) (Pomposiello et Demple, 2001).

Plusieurs gènes sont sous le contrôle d'OxyR. Ceux-ci ont tout d'abord été définis grâce à la plus grande résistance au H₂O₂ qu'il conférait à la cellule par leur présence, ce qui à mener à l'identification d'un groupe de protéines inductible par le H₂O₂. Plusieurs de ces gènes dont l'expression est activée par OxyR possèdent un rôle antioxydant clair. On retrouve par exemple les gènes *katG* (hydroperoxidase I) et *ahpCF* (réductase hydroperoxyde alkyl) qui protègent la cellule des effets toxiques du H₂O₂ en éliminant directement les oxydants (Christman *et al.*, 1985). Les gènes *gorA*, *grxA* et *trxC*, codant respectivement pour la réductase du glutathion, la glurédoxine 1 et la thiorédoxine 2 aident à maintenir la balance thiol-disulfide dans la cellule (Christman *et al.*, 1985; Tao, 1997; Zheng *et al.*, 1998). OxyR induit aussi l'expression de la protéine Dps, une protéine liant l'ADN et qui protège contre les dommages et les mutations causés à l'ADN (Altuvia *et al.*, 1994; Martinez et Kolter, 1997). OxyR induit de plus la transcription du gène *fur*, répresseur global du transport de fer (section 1.3.3). Ceci aide à prévenir la réaction de Fenton qui pourrait se produire et générer, par le contact entre le H₂O₂ et le fer intracellulaire, du OH[•] (section 1.3) (Zheng *et al.*, 1999).

L'activation d'OxyR mène aussi à de hauts niveaux d'un ARNs, *oxyS*. Cet ARNs protège contre la mutagenèse. Cependant le mécanisme de ce rôle anti-mutagène est inconnu. *oxyS* active et réprime l'expression de plusieurs gènes chez *E. coli*. Deux cibles importantes de celui-ci sont les gènes *rpoS* et *fhIA*, qui encode des régulateurs transcriptionnels. On peut donc conclure qu'un des rôles d'*oxyS* serait d'intégrer la réponse au H₂O₂ à d'autres réponses cellulaires au stress en agissant comme un répresseur de la traduction (Altuvia *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 1998). Finalement, OxyR agit comme le répresseur de son propre gène, du gène *agn43* (encode l'antigène 43, une protéine de la membrane externe) (Henderson et Owen, 1999), et du gène *fhuF* (protéine réduisant le fer en ferroxiamine B) (Muller *et al.*, 1998).

1.5.4.2 SoxRS

La régulation par SoxRS se produit en deux étapes (Storz et Zheng, 2000). SoxR est une protéine de 17 kDa qui fait partie de la famille des activateurs transcriptionnels MerR (Amabile-Cuevas et Demple, 1991; Wu et Weiss, 1991). Comme OxyR, un motif hélice-boucle-hélice lui confère sa spécificité de liaison à l'ADN. Cette protéine forme des dimères en solution dont chacun des monomères contient deux centres [2Fe-2S] (Storz et Zheng, 2000). SoxR est produite de façon constitutive. Lorsque le dimère de SoxR est réduit, il n'est pas actif et ne permet donc pas la transcription de *soxS*. Par contre, lorsqu'il est oxydé dû à la présence de O_2^- ou d'oxyde nitrique, il est sous sa forme active et permet la transcription de *soxS*. SoxS par la suite active différents mécanismes de défense contre le O_2^- (Figure 1.10) (Pomposiello et Demple, 2001).

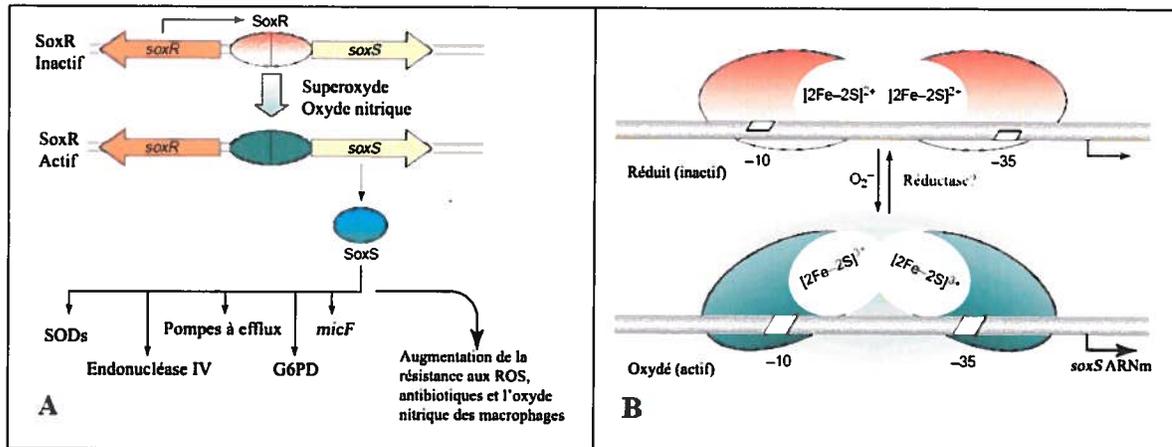


Figure 1.10 : Le régulon SoxRS. A : La protéine SoxR est produite constitutivement et est activée suite à une exposition au superoxyde ou à l'oxyde nitrique (NO). L'oxydation de SoxR augmente la transcription du gène *soxS*, qui est lui aussi un activateur. La protéine SoxS active à son tour la transcription de gènes augmentant la résistance aux oxydants (G6PD = glucose-6-P-déhydrogénase). B : Mécanisme d'activation de SoxR par le superoxyde. Le dimère de SoxR peut se lier à l'ADN sous sa forme réduite ou oxydée. Cependant, seulement la forme oxydée de SoxR active la transcription de *soxS*. Suite à l'exposition au superoxyde, les centres Fe-S sont oxydés et subissent un changement de conformation (Pomposiello et Demple, 2001).

Plusieurs gènes sont sous le contrôle des protéines SoxRS. Ces gènes constituent pour la plupart des gènes permettant à la cellule de résister au O_2^- . Par exemple, on retrouve les gènes *sodA* (SOD-Mn²⁺), *nfo* (enzyme de réparation de l'ADN) et *zwf* (glucose-6-phosphate déhydrogénase) (Greenberg *et al.*, 1990; Tsaneva et Weiss, 1990). L'activation de SoxRS augmente aussi les niveaux de *fumC* (fumarase) et *acnA* (aconitase) (Gruer et

Guest, 1994; Liochev et Fridovich, 1992). Tout comme l'activation par OxyR, SoxRS active *fur*, ce qui permet la diminution de la formation de OH[•] (Zheng *et al.*, 1999). En plus de protéger contre les dommages induits par le O₂⁻, le régulon *soxRS* permet la résistance aux solvants organiques et aux espèces d'azote réactives.

1.5.4.3 Relations entre les régulateurs Fur, OxyR et SoxRS

Lors d'une recherche afin de découvrir d'autres sites de liaison des protéines OxyR et SoxRS, Zheng et ses collaborateurs ont découvert que le gène *fur* présente une boîte de liaison pour OxyR. Dans le cas de SoxRS, ce régulateur active l'expression d'un transcrit contenant les gènes *fldA* (flavodoxine) et *fur*. Donc, OxyR ainsi que SoxRS activent l'expression de Fur, causant une augmentation de la concentration de celui-ci dans la cellule. Sachant que la toxicité du H₂O₂ et du O₂⁻ est exacerbée par la présence de fer, l'activation de Fur par OxyR et SoxRS reflète le mécanisme de défense contre le stress oxydatif (Zheng *et al.*, 1999). De plus, Fur protège contre les dommages oxydatifs et la mutagenèse qu'ils peuvent causer (Touati *et al.*, 1995).

Chapitre 2. Matériel et méthodes

2.1 Les souches utilisées

Plusieurs souches ont été utilisées lors de la réalisation de ce projet. Le tableau 2.1 résume les différentes souches d'*Escherichia coli* utilisées, leurs génotypes, leurs phénotypes (s'il y a lieu) et leurs sources.

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

Souches	Génotypes	Phénotypes	Source ou référence
DH5 α	F- (Φ 80d <i>lacZ</i> ΔM15) Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>endA1</i> <i>recA1 hsdR17</i> (r _K -m _K +) <i>deoR</i> <i>thi-1 supE44 gyrA96 relA1 λ-</i>		BRL Life-Technologies
Tuner™	Δ <i>lon</i> Δ <i>ompT</i> Δ <i>lacZY</i>		Novagen
BW25113	<i>lacI^H</i> r _m B _{T14} Δ <i>lacZ</i> _{WJ16} <i>hsdR514 ΔaraBAD</i> _{ΔH33} Δ <i>rhaBAD</i> _{1,1078}		(Datsenko et Wanner, 2000)
JWK4023	BW25113 Δ <i>soxS</i> :: <i>kan</i>	Km ^R	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
JWK3933	BW25113 Δ <i>oxyR</i> :: <i>kan</i>	Km ^R	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
JWK4024	BW25113 Δ <i>soxR</i> :: <i>kan</i>	Km ^R	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
JWK2388	BW25113 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i>	Km ^R	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
CFT073	<i>Escherichia coli</i> pathogène du tractus urinaire (O6:H1:K2)		(Mobley <i>et al.</i> , 1990)
QT908	CFT073 Δ <i>sitABCD</i> :: <i>tetAR(B)</i>	Tc ^R	Cette étude
QT1081	CFT073 Δ <i>lac</i> ::FRT		Cette étude
QT1090	CFT073 Δ <i>lac</i> ::FRT Δ <i>oxyR</i> :: <i>kan</i>	Km ^R	Cette étude
QT1269	QT908 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i>	Tc ^R Km ^R	Cette étude
QT1279	CFT073 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i>	Km ^R	Cette étude
QT1591	CFT073 Δ <i>lac</i> ::FRT Δ <i>oxyR</i> ::FRT		Cette étude
QT1609	CFT073 Δ <i>lac</i> ::FRT Δ <i>fur</i> :: <i>cat</i>	Cm ^R	Cette étude

Km = kanamycine; Tc = Tétracycline; Cm = chloramphénicol; ^R = résistance.

2.1.1 Souche UPEC CFT073

La souche UPEC CFT073 (O6:H1:K2) a été isolée du sang d'un patient de l'hôpital de l'Université du Maryland ayant développé une pyélonéphrite (Mobley *et al.*, 1990). Son génome, composé de 5,2 Mb, est entièrement séquencé depuis 2002. Aucun plasmide n'a été retrouvé chez cette souche. Après comparaison de son génome avec la souche EHEC EDL933 et la souche K-12 MG1655, il a été découvert que celui-ci comprenait 0,5 Mb de plus que EDL933 et 1 Mb de plus que la souche MG1655 (Welch *et al.*, 2002). C'est cette souche qui a été utilisée tout au cours de la recherche présentée ici. Ce choix s'explique par le fait que d'autres groupes de recherche ont démontré, en utilisant un modèle d'infection urinaire ascendante avec des souris CBA/J, que CFT073 infecte bien les reins et la vessie (Johnson *et al.*, 2005a; Snyder *et al.*, 2004).

2.2 Milieux de croissance et milieux sélectifs

La culture des différentes souches s'est faite, de routine, en milieu LB (Luria-Bertani (*Fisher*)) liquide et solide. Lorsque nécessaire, ces milieux ont été supplémentés par des antibiotiques appropriés pour la sélection et le maintien des mutations et plasmides. Le chloramphénicol et la kanamycine ont été utilisés à une concentration de 30 µg/ml. La tétracycline a été utilisée à une concentration de 12 µg/ml. L'ampicilline a été utilisée à une concentration de 100 µg/ml tandis que la carbénicilline a été utilisée à 40 µg/ml.

Le milieu M9-glucose (liquide et solide) a été utilisé lorsqu'un milieu minimal était désiré. Le milieu M9-glucose est composé des produits suivants : du M9, qui est composé de Na₂HPO₄ 0,04M, KH₂PO₄ 0,02M, NaCl 0,0085M et NH₄Cl 0,02M auquel du MgSO₄·7H₂O 1M, du CaCl₂ 0,01M et du glucose 0,2% ont été ajoutés au milieu.

2.3 Réaction de polymérisation en chaîne

Toutes les expériences de réactions de polymérisation en chaîne (PCR) ont été effectuées à l'aide d'amorces synthétisées par la compagnie *Integrated DNA Technologies (IDT)*, en utilisant la plupart du temps l'ADN polymérase *Taq* de la compagnie *New England Biolabs (NEB)*. Les réactions proprement dites ont été réalisées dans un appareil *Mastercycler Gradient (Eppendorf)*. Lorsqu'une fidélité plus grande était souhaitée, l'ADN polymérase *Herculase (Stratagene)* était utilisée. Les désoxyribonucléiques (dNTPs) utilisées à une concentration de 10 mM chacun étaient fournis par *NEB*. Dans le cas de la polymérase *Taq*, des PCR de 30 cycles ont la plupart du temps été effectuées avec une phase de dénaturation de 2 minutes à 94°C, suivie d'un temps de 30 secondes pour l'hybridation des amorces nucléotidiques à une température se situant entre 50 et 60°C dépendamment des amorces utilisées. Finalement, une phase d'élongation à 72°C suivait pour une durée spécifique dépendamment du fragment d'ADN à amplifier et de l'ADN polymérase utilisée. Pour ce qui est de l'*Herculase*, les mêmes conditions ont été observées en général, excepté que 35 cycles ont été effectués et, qu'étant donnée la nature de l'enzyme, les temps d'élongation de l'ADN étaient plus courts. Afin de vérifier la bonne amplification des fragments d'ADN voulus, ceux-ci ont été déposés (5 µl) sur un gel contenant 1% d'agarose additionné de bromure d'éthidium (EtBr) à une concentration finale de 0,5 µl/ml. Le marqueur d'ADN *2 log (NEB)* a été utilisé afin de déterminer la taille du fragment d'ADN amplifié. Le tableau 2.2 présente les amorces utilisées.

Tableau 2.2 Liste des amorces utilisées pour les différentes expériences.

Nom de l'amorce	Gène visé	Séquence	Utilisation
CMD21	<i>sitABCD</i>	5'-TTGAGCTCGGAATAACGCTTACCGTGTA-3'	Amplification <i>sitABCD::tetAR(B)</i>
CMD24	<i>sitABCD</i>	5'-AAAAGCTTTTGTGTGCCGGTGGTG-3'	Amplification <i>sitABCD::tetAR(B)</i>
CMD177	Opéron <i>lac</i>	5'-CAGCAAATCGCGTTAGC-3'	Amplification <i>lac::Cat</i>
CMD178	Opéron <i>lac</i>	5'-GCATTGATGACGCTTGGGCA-3'	Amplification <i>lac::Cat</i>
CMD366	Opéron <i>lac</i>	5'-GTTATTCGGTACGTGGCGGTAAG-3'	Amplification <i>lac::Cat</i> de CFT073
CMD367	Opéron <i>lac</i>	5'-AACAAACCATGCAAATGCTAAAT-3'	Amplification <i>lac::Cat</i> de CFT073
CMD388	<i>oxyR</i>	5'-CTGGAGATCCGCAAAAGTTC-3'	Amplification <i>oxyR::Km</i>
CMD389	<i>oxyR</i>	5'-CAGATAAATGACGGGGATCAA-3'	Amplification <i>oxyR::Km</i>
CMD604	<i>mutH</i>	5'-CTGCTATGTTGTGTATGGAAGC-3'	Amplification <i>mutH::Km</i>
CMD605	<i>mutH</i>	5'-GTGGCTGGGATAAGCGTAAA-3'	Amplification <i>mutH::Km</i>
CMD874	<i>sitA</i>	5'-GTGGGAATTCGTGCAAATCCTCCCATACAA-3'	Amplification promoteur <i>sitA</i>
CMD875	<i>sitA</i>	5'-TATCGGATCCATAATTTAGTACCTATAGTGAG-3'	Amplification promoteur <i>sitA</i>
CMD1026	<i>katG</i>	5'-GATTCCACTTCTATACGCTTAACCGC-3'	Amplification promoteur <i>katG</i>
CMD1027	<i>katG</i>	5'-Biotin-TCAATGTGCTCCCCTCTACAGTGTAC-3'	Amplification promoteur <i>katG</i>
CMD1028	<i>lacZ</i>	5'-CGGTAGTGGGATACGACGATACCGAAG-3'	Amplification promoteur <i>lacZ</i>
CMD1029	<i>lacZ</i>	5'-Biotin-TTGTAAATACGACGGCCAGAGAATCCG-3'	Amplification promoteur <i>lacZ</i>
CMD1030	<i>sitA</i>	5'-GTGGGGAGAGGTGCAAATCCTCCCATAC-3'	Amplification promoteur <i>sitA</i>
CMD1031	<i>sitA</i>	5'-Biotin-TGCGAGGCCCCCAAGAGCATGGTTAC-3'	Amplification promoteur <i>sitA</i>

2.4 Mutagenèse

Tous les mutants dans le cadre de ce projet ont été réalisés à l'aide de la technique élaborée par Datsenko et Wanner (Datsenko et Wanner, 2000). Brièvement, des amorces présentant une région homologue au gène visé et une région homologue aux plasmides pKD3 (cassette de résistance au chloramphénicol) ou pKD4 (cassette de résistance à la kanamycine) étaient produites. De cette façon, un allèle ayant une région homologue au gène visé était obtenu, avec une cassette de résistance au centre. Par la suite, cet allèle a été transformé dans la souche visée contenant le plasmide pKD46, codant pour les gènes γ , β et *exo*, constituant le système de la λ red recombinase et dont le promoteur est inductible à l'arabinose (50 mM). La protéine GAM, codée par le gène γ , permet

d'inhiber l'exonucléase V RecBCD de la bactérie hôte et permet donc aux produits des gènes β et *exo* d'avoir accès à l'ADN et produire la recombinaison de l'allèle introduit par électroporation (Datsenko et Wanner, 2000). La sélection des transformants a été possible à l'aide de la cassette de résistance de l'antibiotique introduite dans l'allèle. Le plasmide pKD46 a été perdu en incubant les géloses à 37°C, étant donné sa thermosensibilité. La plupart des allèles ont été utilisés directement des mutants générés par le groupe de recherche de Kitagawa (Kitagawa *et al.*, 2005). Dans ces cas, les allèles déjà créés étaient amplifiés directement des souches fournies à l'aide d'amorces spécifiques (Voir Tableau 2.2).

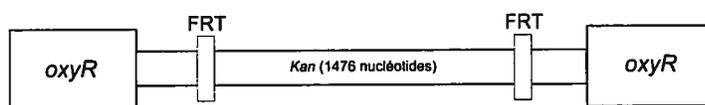


Figure 2.1 : Représentation schématique de l'amplification du produit de PCR servant à la mutation du gène *oxyR* par l'introduction de la cassette de résistance à la kanamycine.

2.5 Transformations bactériennes

Plusieurs souches ont été transformées avec différents plasmides afin d'obtenir les souches utilisées pour cette recherche. La transformation par choc thermique a été utilisée lors de transformations dans les souches de *E. coli* K-12 telles que DH5 α et BW25113. Lors de transformations dans la souche *E. coli* CFT073, l'électroporation a été utilisée. Ces expériences ont été effectuées selon Hanahan, Jessee et Bloom (Hanahan *et al.*, 1991).

2.6 Constructions plasmidiques

Afin d'effectuer les expériences de dosage de la β -galactosidase, deux constructions plasmidiques ont été réalisées. Tout d'abord, la construction pIJ221, qui contient le promoteur du gène *sitA* introduit au site *SmaI* du plasmide pRS415. Ce plasmide contient les gènes *lacZYA* suivant le site d'insertion du promoteur, ainsi qu'un gène de résistance à l'ampicilline.

Afin de réaliser ce clonage, les amorces utilisées (CMD874 et CMD875) ont été phosphorylées. La réaction contenant 15 µl d'amorces, 2 µl de tampon pour ligase 10X (*NEB*), 1 µl de T4 polynucléotide kinase (*NEB*) et 2 µl d'eau a été incubée une heure à 37°C, puis l'inactivation de l'enzyme a été effectuée 20 minutes à 65°C. Par la suite, le fragment du promoteur *sitA* a été amplifié à l'aide de ces amorces phosphorylées et de la polymérase fidèle Herculase (*Stratagene*). Afin d'obtenir des extrémités de PCR non cohésives, une réaction utilisant l'enzyme Klenow (*NEB*) a été réalisée. Un volume de 37 µl de la réaction de PCR, 2 µl de dNTPs, ainsi que 1 µl de la polymérase Klenow composait la réaction. Celle-ci a ensuite été incubée 15 minutes à 25°C puis 1 µl d'acide éthylène diamine tétra acétique (EDTA) a été ajouté à la réaction à une concentration finale de 10 mM. Finalement, l'inactivation de l'enzyme a été effectuée 20 minutes à 75°C. Pour terminer, le plasmide pRS415, digéré avec l'enzyme *SmaI*, et le fragment de PCR *p_{sitA}* ont été collés l'un à l'autre à l'aide de la T4 DNA ligase (*NEB*), résultant du plasmide pIJ221.

Par la suite, afin d'obtenir le plasmide pIJ232, le promoteur *sitA* contenu dans le plasmide pIJ221 a été digéré avec les enzymes *EcoRI* et *BamHI* et introduit dans le vecteur pIJ79 aux mêmes sites. Cette digestion a aussi permis de retirer le promoteur *stg* déjà en place. Le plasmide pIJ79 a été préalablement construit au laboratoire. Ce plasmide consiste en le vecteur d'intégration thermosensible pST76-K auquel une insertion du promoteur *stg* et du gène *lacZ* a été effectuée. Le plasmide de fusion intégratif du promoteur *sitA* avec le gène *lacZ* (pIJ232) a donc été obtenu.

Tableau 2.3 : Tableau présentant les plasmides utilisés.

Plasmides	Caractéristiques	Résistance	Source ou référence
pKD46	Plasmide d'expression de la λ red recombinase, réplication température sensible	Ap ^R	(Datsenko et Wanner, 2000)
pCP20	Plasmide aidant les FLPs, réplication température sensible	Ap ^R , Cm ^R	(Datsenko et Wanner, 2000)
pCA24N	Vecteur d'induction vide	Cm ^R	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
pJW3933	Vecteur d'induction de la protéine OxyR	Cm ^R	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005)
pRS415	Vecteur de fusion d'opérons	Ap ^R	(Simons <i>et al.</i> , 1987)
pST76-K	Vecteur suicide pSC101, réplication température sensible	Km ^R	(Posfai <i>et al.</i> , 1997)
pIJ79	pST76-K::p <i>stg-lacZ</i>	Km ^R	(Lymberopoulos <i>et al.</i> , 2006)
pIJ221	pRS415::p <i>sitA</i> , cloné au site <i>SmaI</i>	Ap ^R	Cette étude
pIJ232	pIJ79 Δ <i>stg</i> ::p <i>sitA</i> de pIJ221 cloné <i>EcoRI</i> et <i>BamHI</i>	Km ^R	Cette étude

Ap = ampicilline; Km = kanamycine; Cm = chloramphénicol; ^R = résistance.

2.7 Coinfections du tractus urinaire des souris

La méthode de coinfection ascendante du tractus urinaire des souris a été adaptée de Hagberg et ses collaborateurs (Hagberg *et al.*, 1983a). Chaque souche mutante a été testée en compétition avec la souche sauvage. La souche CFT073 Δ *lac* (Lac-) a été utilisé en tant que souche sauvage alors que les différents mutants étaient Lac+, permettant une différenciation facile et rapide entre les deux souches.

2.7.1 Préparation de l'inoculum

Lors d'expériences de coinfections du tractus urinaire des souris, la préparation de l'inoculum s'étalait sur plusieurs jours. Les souches à l'étude ont tout d'abord été inoculées à partir de la culture congelée contenant du glycérol sur un pétri contenant l'antibiotique approprié. Après une incubation d'environ 18 heures à une température de

37°C, les bactéries ont été prélevées des boîtes de pétri et inoculées dans une préculture de 5 ml de milieu liquide LB (*Fisher*), toujours avec l'antibiotique approprié. Une fois de plus, les précultures ont été incubées environ 18 heures avec agitation à 37°C. Par la suite, des cultures de plus grands volumes ont été réalisées. Pour chaque souche bactérienne utilisée, deux flacons de 250 ml contenant 55 ml de LB sans antibiotique ont été inoculés avec 100 µl provenant de la préculture. Après une incubation de 18 heures à 37°C avec agitation, la densité optique à 600 nm (D.O.₆₀₀) de chaque culture a été vérifiée (spectrophotomètre *Genesys20/Thermo Spectronic*). Les cultures ont par la suite été mélangés les unes avec les autres afin d'avoir une suspension uniforme des deux souches à testées en coinfection. Suite à une centrifugation de 15 minutes à 3600xg (*Eppendorf Centrifuge 5810R*), les bactéries ont été resuspendues dans la goutte restante. L'inoculum a été gardé dans la glace jusqu'à l'utilisation. Un décompte de l'inoculum par dilution sériée a été effectué en duplicata sur des géloses MacConkey (*Fisher*) afin de s'assurer de la concentration en bactéries pour chaque souche.

2.7.2 Anesthésie des souris

Des souris femelles CBA/J âgées de 6 à 7 semaines (*The Jackson Laboratory, Maine, USA*) ont été utilisées afin de procéder aux infections ascendante du tractus urinaire. Chaque série d'infection s'est vue allouée 15 souris. Avant la cathétérisation, les souris ont été anesthésiées intrapéritonéalement avec un cocktail anesthésiant contenant 5 ml de Kétamine (*Ketaset[®]/Wyeth*), 2,5 ml de Xylazine (*Rompun[®]/Bayer HealthCare*), 1,5 ml d'Acépromazine (*Atravet[®]/Ayerst*) et 1,5 ml de saline. Un volume de 40 µl a été injecté à chacune des souris. La Kétamine est utilisée comme anesthésiant, la Xylazine est utilisée pour permettre un meilleur contrôle de la respiration et l'Acépromazine est un sédatif. Le cocktail était injecté environ 10 minutes avant la cathétérisation de chacune des souris.

2.7.3 Cathétérisation

Les souris ont par la suite été cathétérisées à l'aide de cathéters de polyéthylène (*Becton Dickinson and Company*) de 0,61 mm de diamètre et d'environ 15 mm de longueur, préalablement stérilisés aux rayons ultraviolets (UV). La souris a été placée sur une gaze stérile sur le dos. L'entrée du tractus urinaire de la souris a été désinfectée avec de l'alcool 70%, puis un cathéter a été inséré dans l'urètre de la souris à l'aide de pince

stérile. Tous les instruments utilisés ont été préalablement stérilisés avec de l'éthanol 70% puis dans un stérilisateur à bille (*Inotech*). Avec de légères pressions sur la région de la vessie, l'urine de la souris a été récoltée afin d'en vérifier la stérilité avant l'infection. Un volume de 10 µl de ces échantillons d'urine a été inoculé sur des géloses MacConkey puis les pétris ont été incubés toute la nuit à 37°C. Par la suite, la présence de contamination bactérienne a été vérifiée.

2.7.4 Injection de l'inoculum

Afin d'injecter l'inoculum bactérien préparé précédemment, des seringues de verre (*Hamilton*) attachées à une aiguille 30G (*Becton Dickinson*) ont été remplies avec 20 µl d'inoculum. Celles-ci ont ensuite été insérées dans le cathéter puis l'inoculum a été injecté dans la vessie de la souris. Une fois l'injection terminée, la seringue et le cathéter ont été retirés de l'urètre de la souris. Suite à l'inoculation de toutes les souris, un temps de 48 heures a été alloué à la bonne implantation de l'infection.

2.7.5 Prélèvement des organes et de l'urine

Après 48 heures de développement de l'infection, les souris ont été de nouveau anesthésiées à l'aide de 50 µl du cocktail décrit ci-dessus. Par la suite, les souris ont été euthanasiées à l'aide d'une chambre à dioxyde de carbone (CO₂). L'abdomen des souris a été aspergé d'alcool 70% et de Bétadine (*Rougier*), puis la vessie et les reins ont été prélevés pour chacune. Préalablement au prélèvement, l'extérieur des organes a été échantillonné à l'aide d'un écouvillon stérile imprégné de tampon salin avec gélatine (BSG = NaCl 0,15 M, KH₂PO₄ 2,2 mM, Na₂HPO₄ 4,2 mM, 0,01% (m/v) gélatine). Cette étape permettait de s'assurer de la stérilité extérieure des organes. Cependant, avant de prélever la vessie, l'urine a été récoltée, lorsque possible, à l'aide d'une seringue 1cc et une aiguille 30G, qui servait à aspirer l'urine. Les organes ont été gardés sur glace jusqu'à leur utilisation ultérieure.

2.7.6 Comptage bactérien

À chacun des organes a été ajouté un volume de BSG 1X correspondant à quatre fois le poids de l'organe, afin d'obtenir ainsi une dilution 1:5. Ceux-ci étaient par la suite homogénéisés à l'aide d'un homogénéisateur de type omnimixer. Plusieurs dilutions ont

été effectuées et étalées sur des géloses MacConkey afin de réaliser un dénombrement des bactéries ayant infecté chacun des organes. Le reste des échantillons étaient conservé à 4°C au cas où une dilution plus élevée ait été nécessaire. Après une incubation de 18 heures à 37°C, le nombre d'unités formatrices de colonie (UFC) a été établi pour chacune des souches, soit la souche sauvage (CFT073 Δlac) ou la souche mutante testée (CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ ou CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$). À l'aide des résultats obtenus, des indices de compétition ont été calculés selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Dénombrement finale souche mutante} / \text{Dénombrement final souche sauvage}}{\text{Inoculum initial souche mutante} / \text{Inoculum initial souche sauvage}}$$

Le \log_{10} de ces rapports ont ensuite été calculés, et des graphiques à l'aide des valeurs obtenues ont été créés à l'aide du logiciel *Prism 4* (*GraphPad Software*).

2.8 Tests de sensibilité aux stress oxydatif

La sensibilité au stress oxydatif de la souche CFT073 sauvage, des différents mutants réalisés ainsi que des contrôles *E. coli* K-12 BW25113 (Kitagawa *et al.*, 2005) a été évaluée à l'aide d'un test de diffusion sur gélose molle. Deux milieux ont été utilisés, le milieu riche LB ainsi que le milieu minimal M9-glucose. Des précultures de chacune des souches à tester ont été inoculées dans des bouillons LB avec les antibiotiques appropriés et incubées à 37°C avec agitation la veille de l'expérience. La D.O.₆₀₀ des cultures étaient ensuite ajustée à 0,5. Dans le cas des expériences dans le milieu minimal M9-glucose, les précultures subissaient préalablement un lavage avec ce milieu, consistant en fait d'une centrifugation et d'une resuspension dans le M9-glucose.

Par la suite, un volume de 100 μ l de la suspension de bactéries à une D.O.₆₀₀ de 0,5 a été ajouté à 3 ml de gélose molle (0,5% (m/v) d'agar) maintenue à 50°C constitué de LB ou de M9-glucose sans antibiotiques dépendamment de l'expérience. Le mélange a ensuite été placé sur les géloses de 20 ml (1,5% (m/v) d'agar) préalablement préparées et

uniformément répandu sur celles-ci. Après avoir laissé un temps de solidification, un disque de papier filtre (6 mm de diamètre/*Beckton Dickinson*) a été placé au centre de la gélose et 10 µl de la substance à testée a été déposé sur ce dernier. Les produits suivants ont été testés : peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) 30%, plumbagine 53mM, phénazine éthosulfate (PES) 15 mM et phénazine méthosulfate (PMS) 15 mM. Pour chacune des souches avec chacun des produits testés, les géloses ont été préparées en triplicatas et les expériences ont été répétées à deux reprises. Les géloses ont ensuite été incubées à 37°C pour environ 18 heures en position non inversée. Finalement, les diamètres d'inhibition de croissance ont été mesurés.

2.9 Régulation du promoteur de *sitA* (*p_{sitA}*) par OxyR

2.9.1 Tests de dosage de la β-galactosidase

Les tests de dosage de la β-galactosidase ont été réalisés comme décrit par Miller (Miller, 1992). Deux types de tests ont été réalisés : des dosages sur milieu solide et des dosages en milieu liquide. Pour chacune des souches testées (QT1081+pIJ221, QT1090+pIJ221, QT1609+pIJ221, QT1081+pIJ232, QT1090+pIJ232, QT1609+pIJ232), des cultures fraîches ont été utilisées.

Dans le cas des tests sur géloses, les souches ont été inoculées à partir de la culture congelée contenant du glycérol sur une gélose LB contenant les antibiotiques nécessaires. Suite à une incubation d'environ 18 heures à 37°C, un écouvillon a été utilisé afin de récolter un certain nombre de colonies. Sur une nouvelle gélose, un tapis bactérien a été réalisé, puis les différentes géloses ont été incubées encore une fois 18 heures à 37°C. Pour chaque souche, une gélose inoculée seulement avec des bactéries ou avec une disque imbibé de H₂O₂ (10 µl de la solution à 30%) a été réalisée. Le lendemain, les bactéries ont été récoltées à l'aide d'un écouvillon et ont été resuspendues dans du tampon Z (Na₂HPO₄·7H₂O 60 mM, NaH₂PO₄·H₂O 40 mM, KCl 10 mM, MgSO₄·7H₂O 1 mM et β-

mercaptoéthanol 50 mM) à une D.O.₆₀₀ d'environ 0,35. Dans le cas des géloses avec du H₂O₂, les cellules ont été prélevées à la limite de la zone d'inhibition de croissance.

Pour les tests en milieu liquide, des précultures ont été préparées dans le milieu LB avec les antibiotiques appropriés et incubées à 37°C toute la nuit avec agitation. Le lendemain, de nouvelles cultures ont été mises en croissance avec une D.O.₆₀₀ de départ de 0,02 dans du LB. Après avoir atteint une D.O.₆₀₀ d'environ 0,3, les dosages de la β-galactosidase ont été effectués à toutes les 20 minutes durant 1 heure. Un volume de 10 µl de H₂O₂ 500 mM a été ajouté afin de vérifier si ce produit augmentait l'expression de *psitA*.

Pour les deux types de tests, la D.O.₆₀₀ a été déterminée et des échantillons de 100 µl de bactéries ont été prélevés au moment voulu puis ajouté à 900 µl de tampon Z. Par la suite, un volume de 40 µl de chloroforme et SDS 0,1% ont été ajoutés afin de briser les cellules. Les tubes ont été vortexés durant 10 secondes afin de s'assurer que les cellules étaient bien brisées. Suite à une incubation de 5 minutes à 28°C, 200 µl de *O*-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG) 4 mg/ml ont été ajoutés. La réaction a été chronométrée jusqu'à ce qu'une coloration jaune assez prononcée soit visible (D.O.₄₂₀ entre 0,6 et 0,9). La réaction a été arrêtée à l'aide de 500 µl Na₂CO₃ 1M. Pour chacune des réactions, la D.O.₄₂₀ et la D.O.₅₅₀ ont finalement été mesurées. Les unités de β-galactosidase ont été calculées à l'aide de la formule suivante,

$$\frac{1000 \times (DO_{420} - 1,75 \times DO_{550})}{t \times v \times DO_{600}} = \text{unités } \beta - \text{galactosidase}$$

où *t* est le temps de réaction et *v* est le volume de culture utilisé dans le test.

2.9.2 Surexpression et solubilisation d'OxyR

Afin de surexprimer la protéine OxyR, la souche QT1615 a été utilisée. Cette souche, qui consiste en la souche TunerTM (Novagen), a été transformée avec le plasmide pJW3933 permettant de surexprimer la protéine OxyR. Les cellules TunerTM proviennent de la souche BL21 qui a subi une délétion des gènes *lacZY* et permettent d'ajuster le niveau de protéines uniformément dans toutes les cellules. La mutation de la perméase *lacY* permet une entrée uniforme de l'IPTG (isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside) dans les cellules et donc un niveau d'induction homogène (Novagen, 2002). Il est ainsi possible de mieux contrôler l'induction afin de favoriser la solubilité de la protéine. Le vecteur utilisé pour l'induction de OxyR présentait le gène *oxyR* sous le contrôle du promoteur inductible à l'IPTG pT5-*lac*. Ce plasmide a été fourni par le groupe de Kitagawa (Kitagawa *et al.*, 2005). Ce groupe a créé une librairie de tous les ORFs (Open Reading Frames) d'*E. coli* K-12 W3110 où chaque gène prédit a été cloné sur un vecteur, nommé pCA24N (Figure 2.1).

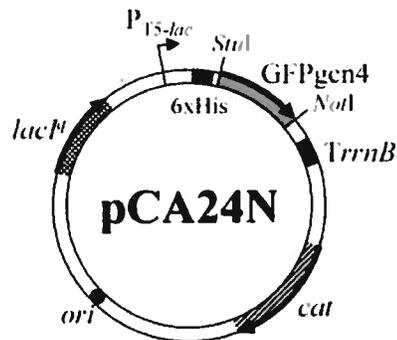


Figure 2.2 : Schéma du vecteur pCA24N et sites de clonage (Tiré de Kitagawa *et al.* 2005)

Le vecteur contient une cassette de résistance au chloramphénicol (*cat*). De plus, le promoteur inductible à l'IPTG pT5-*lac* est régulé par le répresseur LacI (*lacI^q*), qui bloque la transcription en absence d'IPTG. Chaque ORF a été cloné dans ce vecteur à l'aide du site de restriction *StuI* à l'aide d'amorces contenant les sites *SfiI*, permettant d'avoir deux sites *SfiI* pouvant servir à sous-cloner l'ORF ultérieurement dans un vecteur différent. Une queue composée de six histidines a de plus été fusionnée à l'ORF cloné. Finalement, un gène codant pour la GFP (Green Fluorescent Protein) a aussi été fusionné à l'ORF, mais peut être facilement enlevé à l'aide des sites de restriction *NotI* (Kitagawa

et al., 2005). Pour la surexpression de OxyR, le vecteur contenant *oxyR* sans la fusion avec la GFP a été utilisé et transformé dans la souche TunerTM.

La préparation des protéines a été réalisée selon les méthodes suggérées par *Miltenyi Biotec* (Kalivoda *et al.*, 2003) ainsi qu'à l'aide des précisions apportées par Storz et Altuvia (Storz *et* Altuvia, 1994). La souche QT1615 contenant le plasmide inductible a été fraîchement inoculée sur une gélose contenant les antibiotiques nécessaires à partir de la culture congelée contenant du glycérol conservée à -80°C. Suite à une incubation de 18 heures à 37°C, une préculture de la souche en milieu LB a été incubée à 37°C avec agitation toute la nuit. Le lendemain, un bouillon de 100 ml de LB a été inoculé avec 1 ml de la préculture (1/100). Le tout a, par la suite, été incubé environ 3 heures à 37°C avec agitation, ou jusqu'à ce qu'une D.O.₆₀₀ d'environ 0,5 soit atteinte. Un échantillon de protéines à partir de cette culture non induite a été préparé. La culture a ensuite été induite avec 1 mM d'IPTG durant 2 heures, toujours à 37°C avec agitation. Un échantillon de la culture induite totale a été prélevé afin de récolter les protéines. Par la suite, le milieu de culture a été retiré par centrifugation durant 15 minutes à 3600xg et le culot de bactéries induites ainsi obtenu a été resuspendu dans 1,5 ml de tampon sodium phosphate 50 mM à pH 8 contenant 500 mM de NaCl. Ces conditions ont été choisies car OxyR est plus soluble à pH 8 et en présence de sels (Storz et Altuvia, 1994). Par la suite, les cellules ont été brisées par sonication (5 watts, 6 fois durant 10 secondes) (*Sonifier 150/Branson*). À partir de cette étape, toutes les manipulations se sont effectuées sur glace. La solution de protéines a ensuite été centrifugée à 4°C 15 minutes à 20 000xg. La fraction soluble a finalement été recueillie dans un tube propre. Aux différents échantillons de protéines obtenus a été ajouté du tampon de chargement 1X (Tris-HCl pH 6,8 2,4 mM, SDS 6%, glycérol 30%, β-mercaptoéthanol 16%, bleu de bromophénol 90 μM) puis ceux-ci ont été bouillis durant 5 minutes. Afin de vérifier la bonne induction de la protéine, une électrophorèse sur gel d'acrylamide 12% a été effectuée (Tableau 2.4). Le marqueur de poids moléculaire *Mark12TM* (*Invitrogen*) a permis de déterminer la position des protéines sur le gel. OxyR possède un poids moléculaire de 35 kilodaltons (kDa).

Tableau 2.4 : Composition du gel d'acrylamide.

Produits	Gel de séparation	Gel de concentration
Bis acrylamide 30%	4 ml	0,924 ml
Tris-HCl (gel de séparation → 1,5 M pH 8,8) (gel de concentration → 0,5 M pH 6,8)	2,5 ml	1,76 ml
SDS 10%	0,1 ml	0,07 ml
Eau	3,35 ml	4,2 ml
TEMED	5 µl	7 µl
APS 10%	0,05 ml	0,035 ml

SDS, dodécylsulfate de sodium; TEMED, tétra-méthyl-éthylénédiamine; APS, ammonium persulfate.

Tous les échantillons ont par la suite été conservés à -30°C. La migration du gel s'est effectuée 15 minutes à 100 Volts, puis 45 minutes à 200 Volts. Le gel a ensuite été coloré avec une solution de bleu de Coomassie R-250 (*EM Science*) (Bleu de Coomassie 0,5% (m/v) et méthanol 50% (v/v)), puis décoloré à l'aide d'une solution de décoloration (méthanol 45% (v/v), acide acétique 10% (v/v)).

2.9.3 Interaction entre *psitA* et OxyR

Les tests d'interaction entre la protéine OxyR et le promoteur du gène *sitA* ont été effectués à l'aide de la trousse μ MACSTM Streptavidine (*Miltenyi Biotec*). Le promoteur du gène *katG* a servi de contrôle positif et le promoteur du gène *lacZ* a servi de contrôle négatif. Les fragments d'ADN nécessaires au test ont été obtenus à l'aide de la *Herculase* (*Stratagene*) et d'amorces biotinylés en 5' sur l'amorce inverse, qui ont été obtenues chez *IDT* (Tableau 2.2). L'échantillon de protéines solubles obtenu préalablement (section 2.9.2) a été mis en contact durant 10 minutes avec l'ADN biotinylé préparé dans les proportions suivantes : 100 µl d'ADN (50 ng/µl), 100 µl de protéines (0,8 µg par test), 250 µl de tampon d'interaction (Tris-HCl 20 mM pH8, EDTA 1 mM, glycérol 5% (v/v), DTT 1 mM, Triton X-100 0,01% (v/v)). Suite à l'incubation, le mélange a été examiné afin de s'assurer qu'aucun agrégat n'était visible, ce qui aurait pu nuire aux étapes ultérieures. Par la suite, 50 µl de microbilles de streptavidine μ MACS (μ MACSTM *Streptavidin MicroBeads*) ont été ajoutées au mélange d'ADN et de protéines.

La microcolonne a ensuite été placée dans le *thermoMACS* attaché au *MultiStand* et 100 µl de tampon d'équilibration pour protéines (*Equilibration buffer for protein applications*) a été ajouté à celle-ci afin de la préparer à recevoir l'échantillon. La colonne a ensuite été lavée à deux reprises avec 100 µl du tampon d'interaction contenant du NaCl à 100 mM, puis la réaction d'interaction a été appliquée sur la colonne. Le liquide élué de la colonne a été récupéré dans un tube propre. La colonne a par la suite été lavée à six reprises à l'aide de 100 µl de tampon d'interaction additionné de NaCl 100 mM et chacun des lavages a été récupéré dans des tubes propres. L'élution des protéines réagissant avec le ligand dans la colonne, c'est-à-dire les protéines qui ont montré une propriété d'adhésion au fragment d'ADN biotinylé, ont été éluées avec 150 µl de tampon d'interaction contenant 1 M de NaCl. Chacune des gouttes d'élution a été récoltée dans un tube propre. Par la suite, certaines gouttes ont été ajoutées les unes aux autres afin d'avoir un nombre moins important d'échantillons. Une électrophorèse sur gel d'acrylamide a été effectuée afin de vérifier si des protéines ont adhéré au fragment d'ADN (Voir section précédente). Les bandes correspondant aux protéines obtenues ont été séquencées à l'aide de la spectrométrie de masse afin de s'assurer qu'elles correspondaient bien à OxyR.

2.9.4 Vérification par immunobuvardage de type Western

Afin de vérifier que la protéine induite ainsi que l'élution de la protéine adhérente était bien la protéine OxyR, une vérification par immunobuvardage de type Western a été effectuée sur les échantillons. Pour ce faire, la sonde *HisProbeTM-HRP* (Pierce), collant à la queue histidine ajoutée à la protéine OxyR, a été utilisée. Cette sonde permet la détection directe d'une queue histidines car elle consiste en fait en un dérivé de la HRP (Horseradish peroxidase) possédant des Ni²⁺ actif (Figure 2.3) (Pierce, 2005).

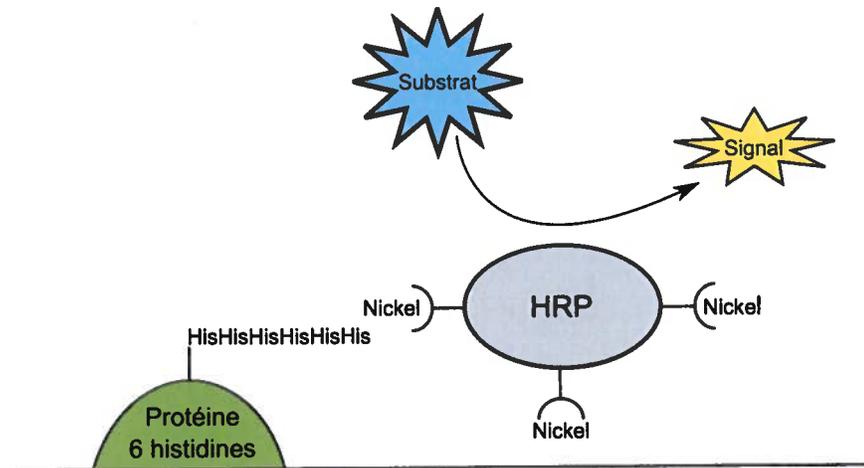


Figure 2.3 : Fonctionnement de la sonde HisProbe™-HRP.

Tout d'abord, une électrophorèse sur gel d'acrylamide a été réalisée comme décrit à la section 2.9.2. Par contre, le marqueur de poids moléculaire utilisé était le *SeeBlue® Plus2* (Invitrogen). Le transfert des protéines sur une membrane de nitrocellulose (*Hybond™-C extra*/Amersham LIFE SCIENCE) a été réalisé à l'aide du *Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfercell* (Biorad). La solution de transfert utilisée était composée de Tris pH 8,3 25 mM, de glycine 0,192 M, de SDS 0,1% et de méthanol 20%. Le transfert a été effectué 1 heure à 100 Volts. Par la suite, les sites non spécifiques de la membrane ont été bloqués à l'aide de 10 ml de tampon de blocage (*StartingBlock™ Blocking Buffer* additionné de Tween-20® 0,05%/Pierce) durant 1 heure à la température de la pièce avec agitation. La membrane a ensuite été lavée à deux reprises durant 10 minutes avec 15 ml de TBST (Tris pH 7,6 25 mM, NaCl 0,15 M, Tween-20® 0,05%). Puis, la membrane a été incubée 1 heure avec agitation avec 20 ml de *HisProbe-HRP Working Solution* (*HisProbe-HRP* dans tampon de blocage 1 :5000). Quatre lavages de 10 minutes avec 15 ml de TBST ont été effectués. La membrane a finalement été incubée avec la solution révélatrice (*SuperSignal Working Solution*/Pierce) durant 5 minutes, puis celle-ci a été placée sur un papier parafilm (*ParafilmM*). Les protéines retrouvées sur la membrane ont été détectées à l'aide de l'appareil *Chemigenius* (Syngene) à des temps de 10 secondes, 30 secondes, 1 minute, 2 minutes et 5 minutes et une photographie a été prise.

2.10 Analyses statistiques

Toutes les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *Prism 4 (GraphPad Software)*. Dans le cas des résultats des coinfections chez la souris, le *Column statistics/Wilcoxon signed-rank test* utilisant un niveau de confiance de 95% a été effectué afin de déterminer si les différences observées étaient statistiquement valables. L'analyse des tests de sensibilité aux stress oxydatif ainsi que de dosage de la β -galactosidase a été effectuée à l'aide d'un t test non pairé.

Chapitre 3. Résultats

3.1 Coinfections du tractus urinaire des souris

Comme mentionné précédemment, des coinfections mettant en compétition la souche CFT073 Δlac ainsi que les différents mutants à tester ont été réalisées, permettant d'observer facilement des différences au niveau de la capacité d'infection des souches. Cette technique a de plus permis de restreindre le nombre de souris utilisées pour les expériences. Tout d'abord, il était important d'établir le nombre de bactéries contenu dans la culture de départ afin de pouvoir comparer le nombre de bactéries injectées et le nombre de bactéries dénombrées suite à l'infection. Ainsi, il était possible de calculer le nombre d'UFC pour chaque culture (Tableau 3.1) ainsi que l'indice de compétition à l'aide de la formule présentée à la section 2.7.6.

Tableau 3.1 : Nombre d'UFC/ml de l'inoculum de départ.

Coinfections	Nombre de UFC/ml calculé
CFT073 Δlac et CFT073 sauvage	9,48 x 10 ¹⁰ 9,75 x 10 ¹⁰
CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta sitABCD$	7,700 x 10 ¹⁰ 1,210 x 10 ¹¹
CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta mntH$	1,365 x 10 ¹¹ 1,440 x 10 ¹¹
CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$	1,240 x 10 ¹¹ 1,210 x 10 ¹¹

Il est possible de remarquer que pour la plupart des coinfections, les deux souches se retrouvaient en quantité équivalente. De plus, les contrôles d'urine prélevés avant l'infection n'ont révélé aucune infection préalable originant d'une autre souche microbienne chez les souris. Finalement, tous les contrôles de stérilité avant le prélèvement des reins et de la vessie se sont révélés négatifs (résultats non présentés).

L'importance des systèmes SitABCD et MntH pour la virulence de la souche CFT073 chez le modèle murin d'infection urinaire ascendante n'a jamais été démontrée. Des coinfections de souris ont donc été effectuées afin de vérifier ce rôle. Les souches

utilisées sont CFT073 sauvage, CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$.

Tout d'abord, la virulence des souches CFT073 sauvage et CFT073 Δlac a été comparée à l'aide du prélèvement des organes et d'un compte bactérien (Figure 3.1), L'indice de compétition de chaque organe, c'est-à-dire le rapport entre la souche sauvage et mutante, est présenté dans les figures 3.1 à 3.4.

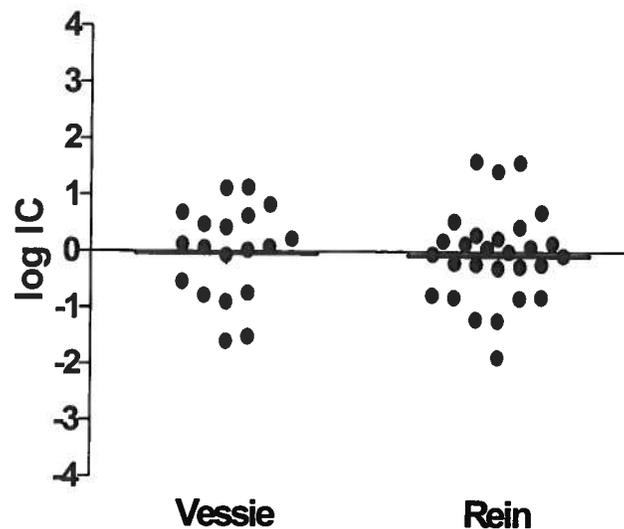


Figure 3.1 : Indice de compétition entre les souches CFT073 sauvage et CFT073 Δlac dans la vessie et les reins. La barre représente la moyenne. Les valeurs sous 0 représentent des échantillons où la souche CFT073 sauvage a prédominé, tandis que les valeurs au-dessus 0 correspondent à des échantillons où la souche CFT073 Δlac a prédominé. IC : Indice de compétition.

Cette étape visait à permettre de déterminer si une différence dans la virulence était observable entre les deux souches en question. La figure précédente montre qu'il n'y a aucune différence significative au niveau de la virulence entre la souche CFT073 sauvage et CFT073 Δlac . En effet, tant dans la vessie que dans les reins, l'indice de compétition est égal à 0. Ceci signifie que le nombre de bactéries retrouvé dans les organes après l'infection est identique pour les deux souches. Celles-ci ont le même niveau de virulence. Il a donc été décidé d'utiliser la souche CFT073 Δlac afin de tester en coinfection les autres mutants. Ce choix s'explique par le fait qu'il était ainsi plus facile

de différencier les deux souches inoculées aux souris, sans avoir recours à des manipulations fastidieuses telle étaler tous les échantillons sur deux types de géloses, sans antibiotiques et avec antibiotiques, puis effectuer la soustraction des deux résultats. Les mutants testés étant de phénotype Lac+, en utilisant la souche CFT073 Δlac , il était ainsi possible d'identifier facilement la souche mutante et la souche sauvage (CFT073 Δlac). Plusieurs groupes ont utilisé cette technique permettant de faciliter la visualisation des résultats (Anfora *et al.*, 2007; Haugen *et al.*, 2007; Sabri *et al.*, 2008).

Par la suite, le mutant CFT073 $\Delta sitABCD$ a été testé en coinfection avec la souche CFT073 Δlac . Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3.2, toujours sous la forme d'indice de compétition.

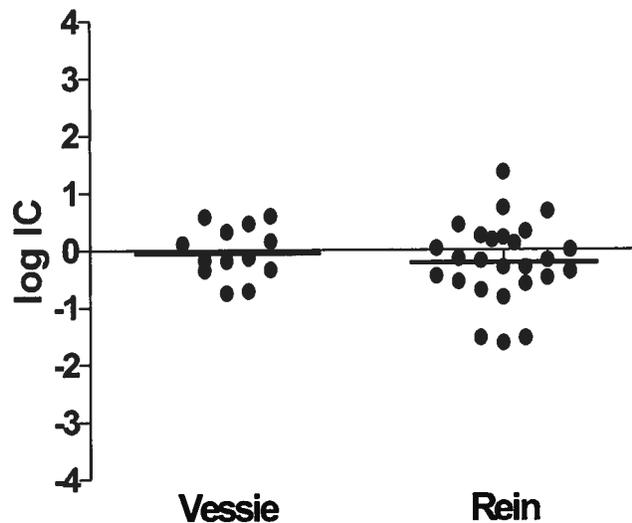


Figure 3.2 : Indice de compétition entre les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta sitABCD$ dans la vessie et les reins. La barre représente la moyenne. Les valeurs sous 0 représentent des échantillons où la souche CFT073 Δlac a prédominé, tandis que les valeurs au-dessus 0 correspondent à des échantillons où la souche CFT073 $\Delta sitABCD$ a prédominé. IC : Indice de compétition.

Il est possible de constater qu'il n'y a aucune différence au niveau de la virulence entre ces deux souches, tant au niveau de la vessie que des reins. Donc, ces résultats démontrent que la perte du système SitABCD chez la souche CFT073 n'affecte pas la virulence de la souche.

Par la suite, le mutant CFT073 $\Delta mntH$ a été testé en coinfection avec la souche CFT073 Δlac . Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3.3, toujours sous la forme d'indice de compétition.

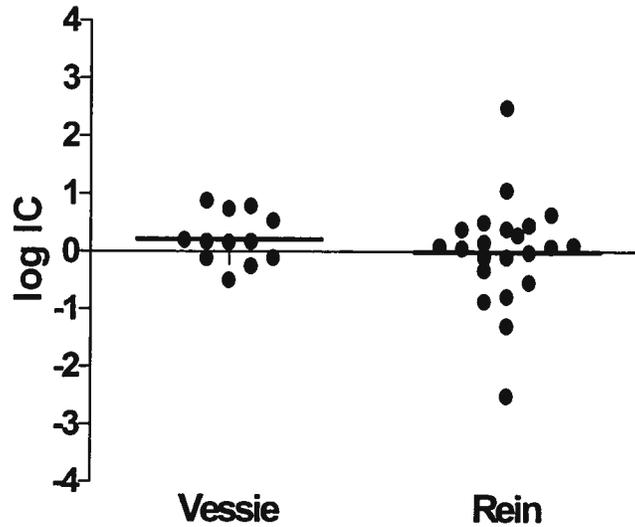


Figure 3.3 : Indice de compétition entre les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta mntH$ dans la vessie et les reins. La barre représente la moyenne. Les valeurs sous 0 représentent des échantillons où la souche CFT073 Δlac a prédominé, tandis que les valeurs au-dessus 0 correspondent à des échantillons où la souche CFT073 $\Delta mntH$ a prédominé. IC : Indice de compétition.

Il est possible de constater qu'il n'y a aucune différence significative au niveau de la virulence entre ces deux souches, tant au niveau de la vessie que des reins. Donc, ces résultats démontrent que la perte du système MntH chez la souche CFT073 n'affecte pas la virulence de la souche.

Finalement, la souche CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ a été testée en coinfection avec la souche CFT073 Δlac . Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 3.4, toujours sous la forme d'indice de compétition.

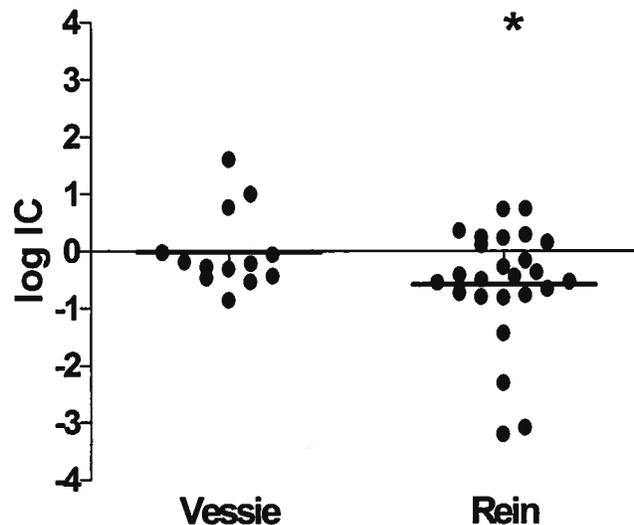


Figure 3.4 : Indice de compétition entre les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ dans la vessie et les reins. La barre représente la moyenne. Les valeurs sous 0 représentent des échantillons où la souche CFT073 Δlac a prédominé, tandis que les valeurs au-dessus 0 correspondent à des échantillons où la souche CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ a prédominé. * $p < 0,005$ par rapport à 0. IC : Indice de compétition.

Il est possible de constater une baisse significative de virulence pour le mutant $\Delta sitABCD\Delta mntH$ par rapport à la souche CFT073 Δlac au niveau des reins. En effet, la valeur de la moyenne obtenue est de -0,5842 ($p = 0,0028$). En d'autres mots, la souche CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ s'est retrouvée en moins grande quantité dans les reins des souris. Cependant, aucune différence significative n'est retrouvée au niveau de la vessie. La figure 3.4 démontre donc que la perte des deux systèmes, SitABCD et MntH, diminue la virulence de la souche d'environ 5 fois au niveau des reins.

3.2 Sensibilité au stress oxydatif

Par la suite, la sensibilité à différents agents causant un stress oxydatif a été testée chez plusieurs souches : CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$, CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$, BW25113 sauvage, JW4023 ($\Delta soxS$), JW3933 ($\Delta oxyR$) et JW4024 ($\Delta soxR$). En effet, par des analyses bioinformatiques, un motif semblable à la boîte de fixation du régulateur OxyR a été identifié à l'intérieur du promoteur du gène *sitA* (Figure 3.5) (Kehres *et al.*, 2002a). Nous avons donc voulu vérifier si ce régulateur de la réponse au stress oxydatif de type H_2O_2 jouait un rôle dans la régulation de SitABCD.

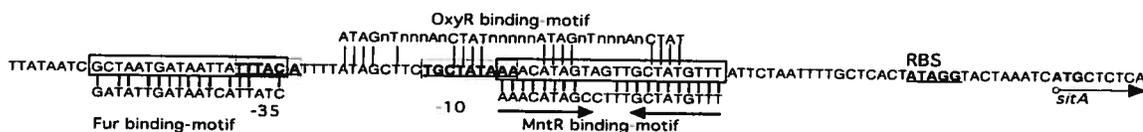


Figure 3.5 : Site putatif de liaison de OxyR au promoteur du gène *sitA*.

L'influence de la présence des systèmes SitABCD et MntH sur la résistance au stress oxydatif a donc été étudiée. Deux milieux de croissance ont été utilisés, un milieu riche (gélose LB) ainsi qu'un milieu minimal (gélose M9-glucose). De plus, quatre produits chimiques ont été utilisés afin de reproduire différents types de stress oxydatifs : le H_2O_2 , la plumbagine, la phénazine méthosulfate ainsi que la phénazine éthosulfate. Plusieurs contrôles dérivés de la souche K-12 BW25113 ont été utilisés afin de confirmer le type de stress auxquels les bactéries faisaient face. En effet, comme mentionné précédemment, la protéine OxyR régule la réponse au H_2O_2 (section 1.5.4.1), tandis que les protéines SoxR et SoxS régule la réponse à l'anion superoxyde (section 1.5.4.2). En mutant ces gènes, la réponse à ces ROIs est dérégulée. Ainsi, la hausse de sensibilité de ces souches contrôles sont un indice de la présence de H_2O_2 ou de O_2^- causée par les différents produits.

3.2.1 H₂O₂

La sensibilité des souches a tout d'abord été testée avec le H₂O₂. La figure 3.6 présente les résultats obtenus pour la souche sauvage BW25113 ainsi que les différents mutants dérivés de celle-ci, sur milieux LB et M9-glucose. Il est à noter que cette souche est une souche d'*E. coli* K-12 (Tableau 2.1), et représente donc un contrôle provenant d'une souche non pathogène.

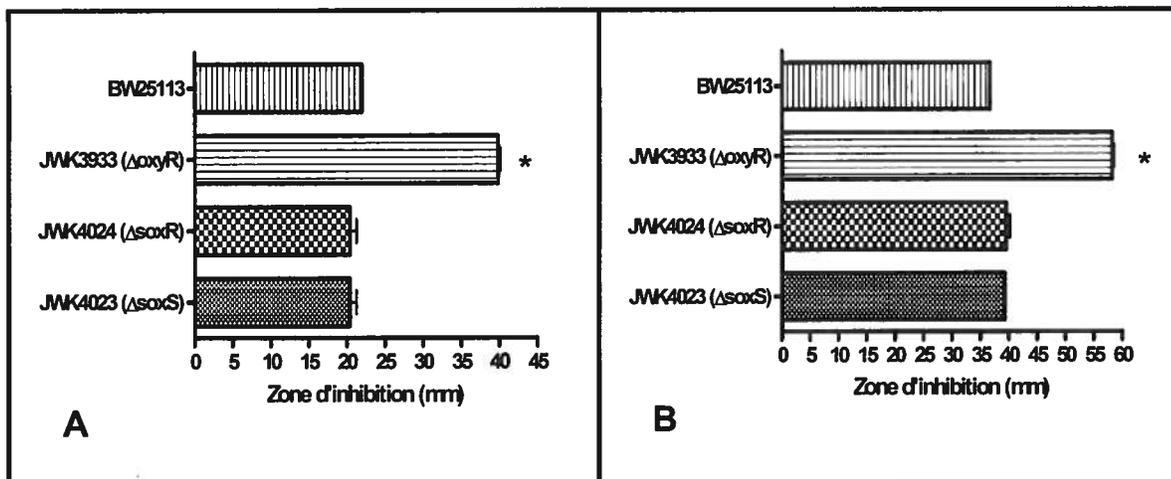


Figure 3.6 : Sensibilité au H₂O₂ de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$). **A :** Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. **B :** Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose. * $p < 0,0001$.

La figure 3.6 illustre que seule la souche JWK3933 ($\Delta oxyR$) est plus sensible au H₂O₂, tant sur milieu riche que sur milieu minimal. Sachant qu'OxyR est le régulateur de la réponse au H₂O₂, ces résultats sont en accord avec la théorie et permettent de conclure que le stress encouru par les bactéries est bien par le H₂O₂. De plus, les différentes souches sont plus sensibles à cet agent sur milieu minimal que sur milieu LB.

Par la suite, les souches uropathogènes dérivées de la souche CFT073 parentale ont été testées, dans les mêmes conditions que précédemment. La figure 3.7 présente les résultats obtenus.

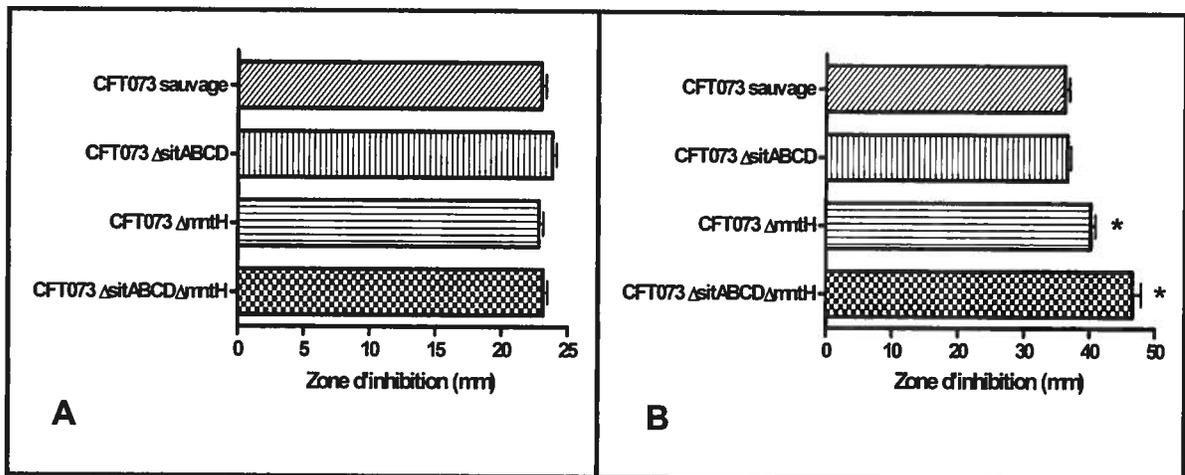


Figure 3.7 : Sensibilité au H_2O_2 de la souche CFT073 sauvage, CFT073 Δ sitABCD, CFT073 Δ mntH et CFT073 Δ sitABCD Δ mntH. A : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. B : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose. * $p < 0,005$.

On constate que sur milieu LB, les différents mutants ne sont pas plus sensibles au H_2O_2 que la souche sauvage. Cependant, sur milieu minimal, les souches CFT073 Δ mntH et CFT073 Δ sitABCD Δ mntH sont plus sensibles que la souche sauvage. De plus, cette dernière est sensible à un degré encore plus élevé. Finalement, tout comme pour les souches K-12 présentés à la figure 3.6, la souche CFT073 sauvage ainsi que les souches dérivées de celle-ci sont plus sensibles au H_2O_2 lorsqu'elles croissent sur un milieu minimal.

3.2.2 Plumbagine

Par la suite, les mêmes souches mentionnées précédemment ont été testées afin d'évaluer leur sensibilité à un deuxième agent générant des ROIs, la plumbagine. Cet agent génère du H_2O_2 et du O_2^- dans la cellule. Les résultats obtenus pour la souche K-12 et ses dérivés sont présentés à la figure 3.8.

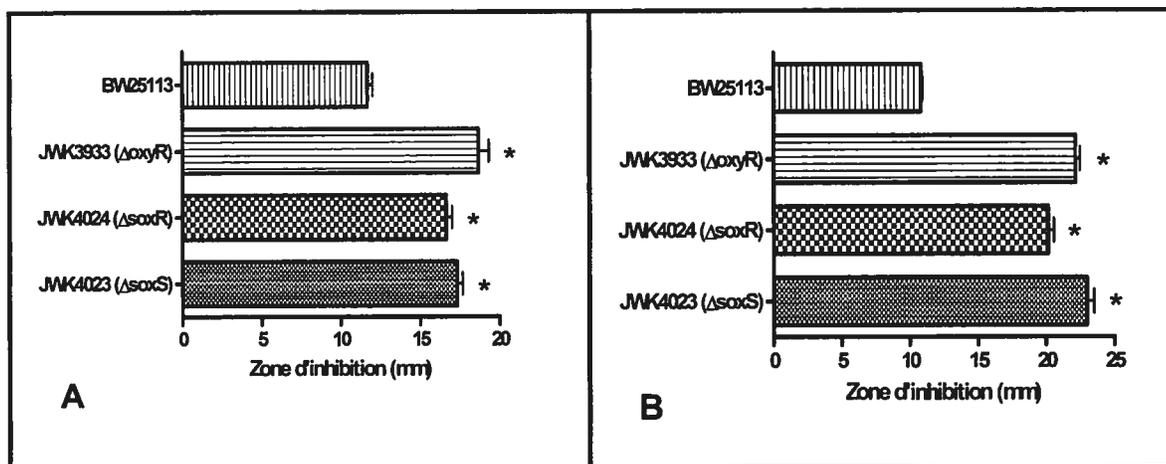


Figure 3.8 : Sensibilité à la plumbagine de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$). **A :** Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. **B :** Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose. * $p < 0,001$.

Tant sur milieu riche que minimal, les trois mutants ($\Delta oxyR$, $\Delta soxR$ et $\Delta soxS$) démontrent une plus grande sensibilité à la plumbagine. De plus, une sensibilité supérieure est observée sur milieu minimal. Il est donc possible d'affirmer que la plumbagine crée un stress oxydatif dû à la production du H_2O_2 et du O_2^- chez les bactéries.

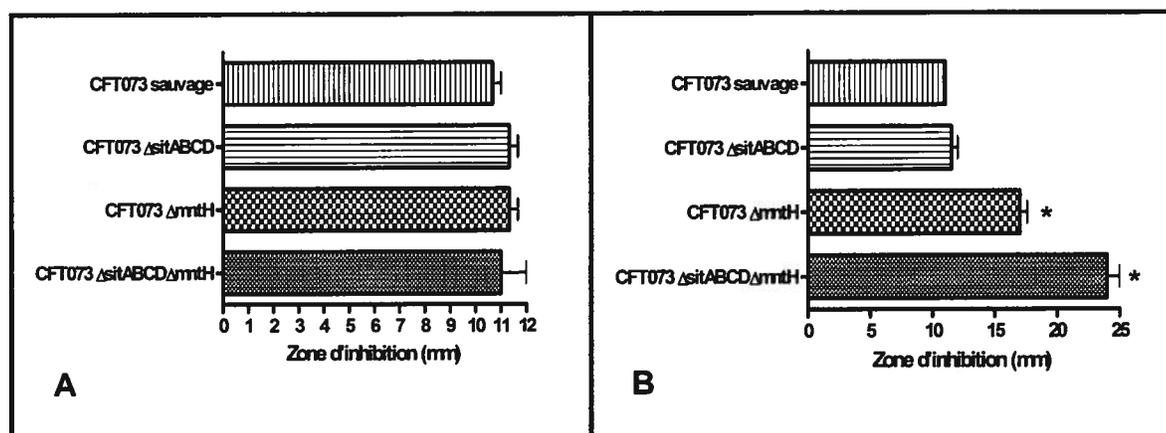


Figure 3.9 : Sensibilité à la plumbagine de la souche CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$. **A :** Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. **B :** Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose. * $p < 0,01$.

Dans le cas des résultats des mutants de la souche CFT073 présentés à la figure 3.9, aucune augmentation de la sensibilité à la plumbagine n'a été observée sur un milieu riche. Cependant, lors de la croissance sur un milieu minimal, une sensibilité plus élevée

a été observée pour les souches CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$, cette dernière étant encore plus élevée. Ces résultats sont comparables aux résultats obtenus lors des tests impliquant le H_2O_2 .

3.2.3 Phénazine méthosulfate

Le troisième produit testé a été la phénazine méthosulfate. Cet agent génère du O_2^- dans la cellule. Les résultats obtenus pour les contrôles K-12 sont présentés à la figure 3.10.

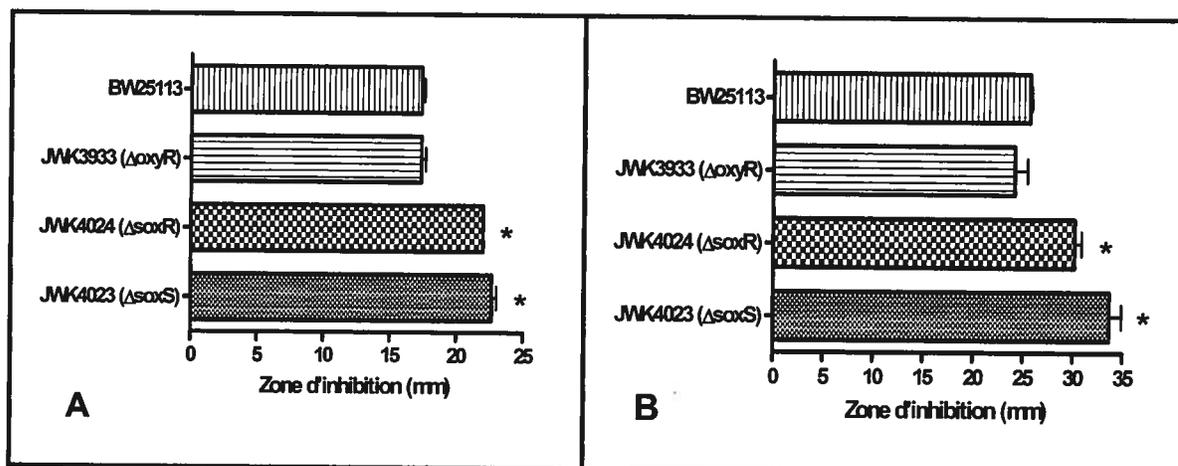


Figure 3.10 : Sensibilité à la phénazine méthosulfate de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$). A : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. B : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose. * $p < 0,0001$.

Les contrôles réalisés avec les souches d'*E. coli* K-12 démontrent une plus grande sensibilité des mutants $\Delta soxR$ et $\Delta soxS$ à ce produit. Ces résultats suggèrent que la phénazine méthosulfate génère un stress à l'aide du O_2^- .

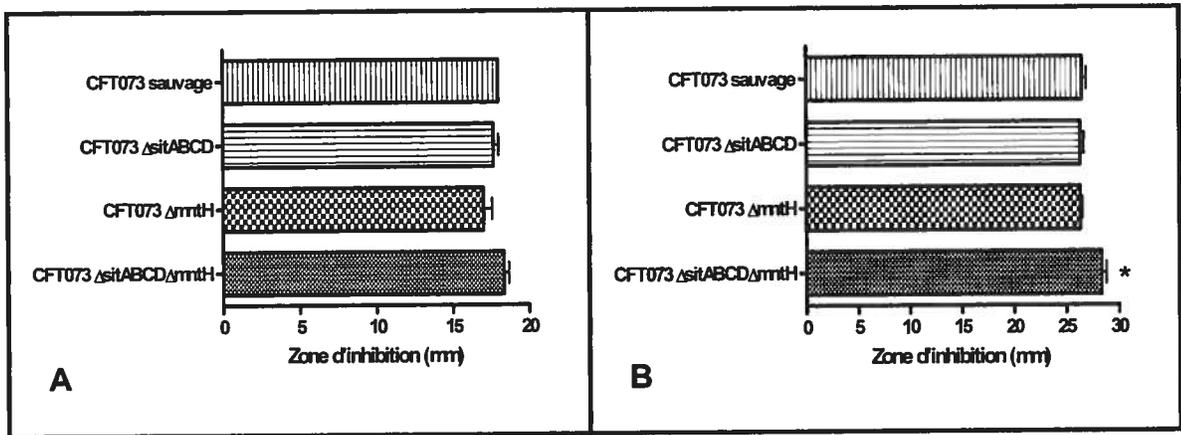


Figure 3.11 : Sensibilité à la phénazine méthosulfate de la souche CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$. A : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. B : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose. * $p < 0,05$.

Les différents résultats obtenus pour les mutants de la souche CFT073 sont présentés à la figure 3.11. Il est possible de constater sur le milieu riche qu'aucun mutant n'est affecté par la phénazine méthosulfate. On remarque cependant une légère hausse de la sensibilité du double mutant ($\Delta sitABCD\Delta mntH$) sur un milieu minimal.

3.2.4 Phénazine éthosulfate

Finalement, la phénazine éthosulfate a été testée chez toutes les souches. Cet agent génère du O_2^- dans la cellule. La figure 3.12 montre les résultats obtenus avec les contrôles K-12.

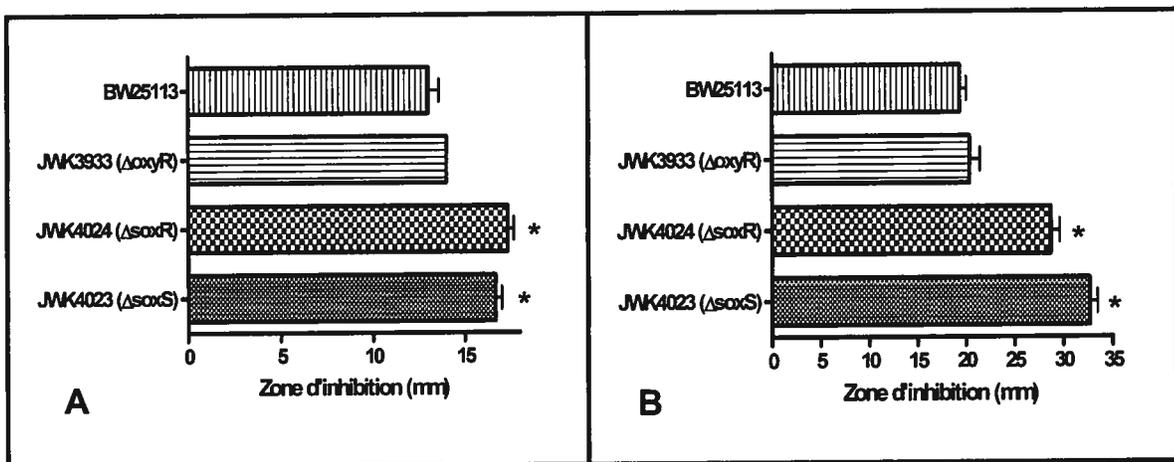


Figure 3.12 : Sensibilité à la phénazine éthosulfate de la souche BW25113 sauvage, JW3933 ($\Delta oxyR$), JW4024 ($\Delta soxR$) et JW4023 ($\Delta soxS$). A : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. B : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose. * $p < 0,005$.

Il est possible de remarquer que les résultats obtenus sont semblables aux résultats présentés pour la phénazine méthosulfate. En effet, seuls les mutants $\Delta soxR$ et $\Delta soxS$ ont montrés une sensibilité accrue à la phénazine éthosulfate, démontrant encore une fois un stress de type O_2^- .

Finalement, la sensibilité des souches dérivées de CFT073 a été déterminée et les résultats sont présentés à la figure 3.13.

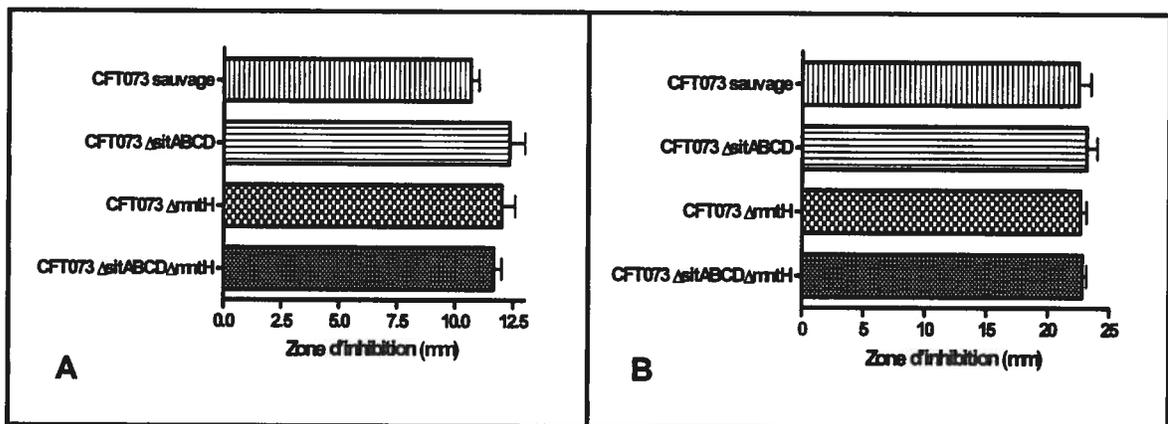


Figure 3.13 : Sensibilité à la phénazine éthosulfate de la souche CFT073 sauvage, CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$ et CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$. A : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu LB. B : Zones d'inhibition de croissance (mm) sur milieu M9-glucose.

Aucune hausse de sensibilité n'a été observée, tant sur milieu riche que sur milieu minimal.

3.3 Régulation de p_{sitA} par OxyR

3.3.1 Essais β -galactosidase

Afin d'étudier la régulation du gène *sitA*, des vecteurs de fusions du promoteur *sitA* au gène *lacZ* ont été réalisés. Deux vecteurs ont été construits : pIJ221, un vecteur exprimé en plusieurs copies dans la cellule provenant du plasmide pRS415, présentant une origine de réplication pBR322, ainsi que pIJ232, un vecteur d'intégration se retrouvant en une seule

copie dans la cellule. Les souches CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ ont été utilisées afin d'évaluer l'expression de *sitA* dans différentes conditions.

L'expression en milieu liquide a tout d'abord été évaluée. Pour ce faire, le milieu LB a été utilisé. L'expression de *sitA* chez les différents mutants (Δlac , $\Delta lac\Delta oxyR$, $\Delta lac\Delta fur$) transformés avec le plasmide pIJ221 a été mesurée dans le temps, en absence ainsi qu'en présence de H₂O₂. Les résultats sont présentés à la figure 3.14.

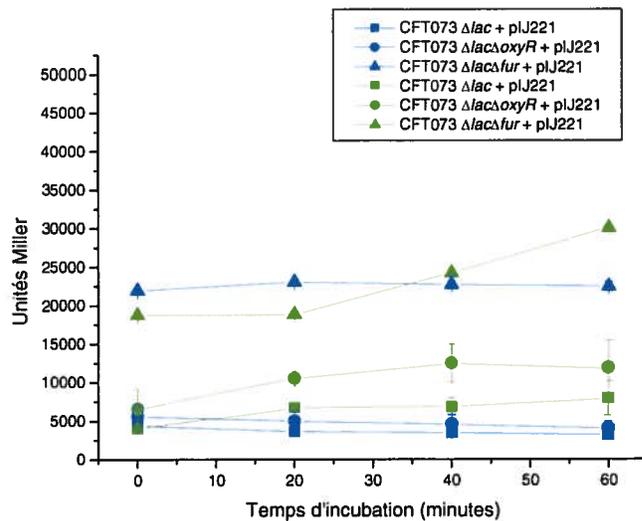


Figure 3.14 : Expression dans le temps du promoteur *sitA* chez les souches CFT073 Δlac (carrés), CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ (cercles) et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ (triangles) transformées du vecteur pIJ221. Les courbes de couleur bleue représentent les échantillons sans H₂O₂ et les courbes de couleur verte représentent les échantillons avec H₂O₂. Les résultats présentés représentent la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas.

Pour chacune des souches, l'ajout de H₂O₂ augmente l'expression du promoteur *sitA* (courbes vertes). De plus, on remarque que le niveau d'expression de départ de *sitA* chez la souche CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ est beaucoup plus élevé que chez les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$.

Par la suite, les mêmes tests en milieu LB liquide ont été effectués chez les différents mutants de CFT073 (Δlac , $\Delta lac\Delta oxyR$, $\Delta lac\Delta fur$) contenant le plasmide pIJ232 intégré au génome des bactéries. L'expression de *sitA* a été comparée en absence ou en présence de H_2O_2 . Les résultats sont présentés à la figure 3.15.

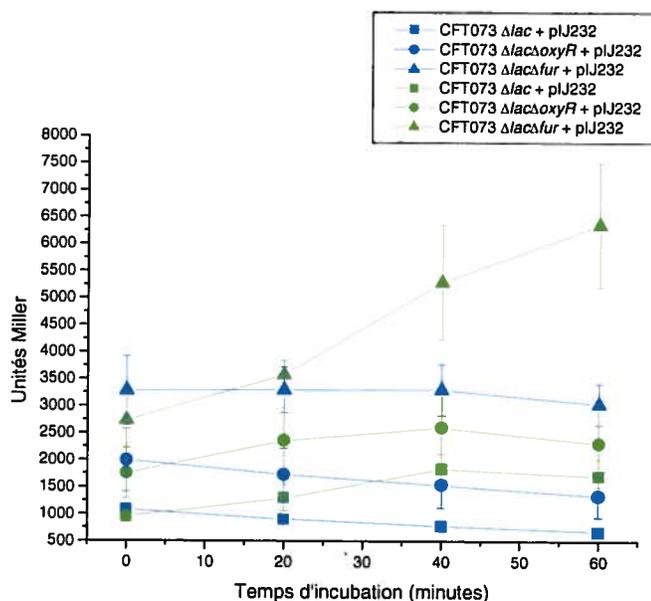


Figure 3.15 : Expression dans le temps du promoteur *sitA* chez les souches CFT073 Δlac (carrés), CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ (cercles) et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ (triangles) transformées du vecteur pIJ232. Les courbes de couleur bleue représentent les échantillons sans H_2O_2 et les courbes de couleur verte représentent les échantillons avec H_2O_2 . Les résultats présentés représentent la moyenne d'au moins trois expériences indépendantes réalisées en triplicatas.

Encore une fois, il est possible de constater que pour chacune des souches, l'ajout de H_2O_2 augmente l'expression du promoteur *sitA*. La souche CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ démontre à nouveau une plus grande expression de *sitA* comparée aux souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$, bien qu'elle soit moins importante ici. De plus, les niveaux d'unités Miller observés sont moins élevés comparativement à la figure 3.14, puisqu'une seule copie est présente par cellule.

Par la suite, des tests sur géloses ont été effectués afin de vérifier si l'expression de *sitA* conservait la même tendance que pour les tests effectués en milieu liquide. De plus, comme les tests liquides représentaient des résultats pour la phase exponentielle de croissance des bactéries, ces tests sur géloses permettaient de comparer les résultats précédents avec des résultats obtenus en phase stationnaire de croissance. Aussi, un milieu riche (LB) et un milieu minimal (M9-glucose) ont été utilisés afin de déterminer si la concentration en ions jouait un rôle dans l'expression de *sitA*. Les résultats obtenus sur milieu LB sont présentés à la figure 3.16.

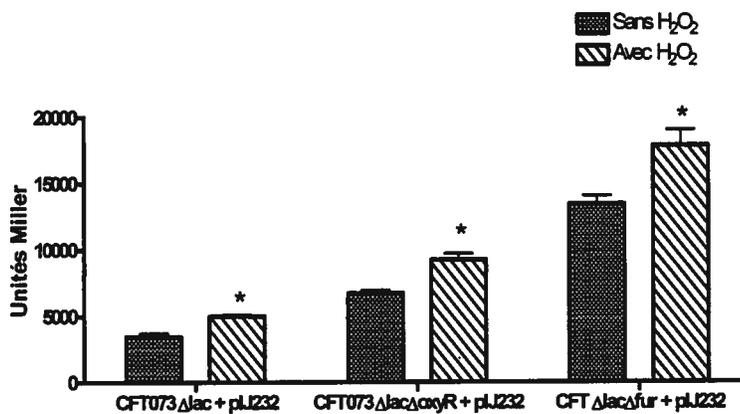


Figure 3.16 : Expression du promoteur *sitA* chez les souches CFT073 Δ lac, CFT073 Δ lac Δ oxyR et CFT073 Δ lac Δ fur transformées du vecteur pIJ232 sur un milieu solide LB. L'ajout de H₂O₂ s'est effectué à l'aide d'un disque imprégné du produit placé au centre de la gélose inoculée. * p < 0,005.

On remarque la même tendance que pour les résultats obtenus en milieu LB liquide, c'est-à-dire que l'ajoute de H₂O₂ augmente l'expression du promoteur de *sitA*. De plus, la souche CFT073 Δ lac Δ fur montre toujours le plus haut niveau d'expression.

Finalement, la figure 3.17 présente les résultats obtenus sur le milieu minimal M9-glucose.

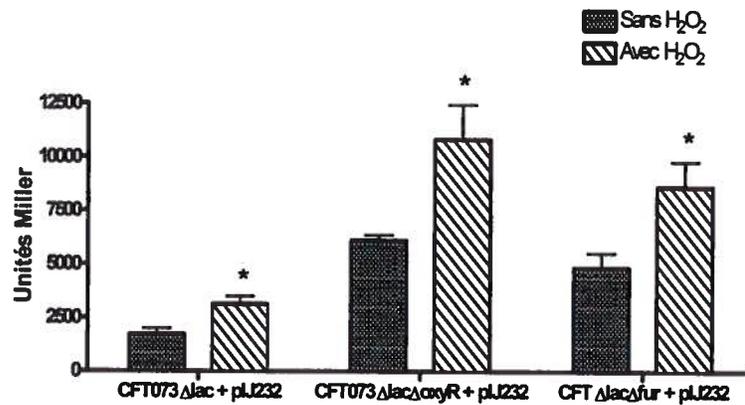


Figure 3.17 : Expression du promoteur *sitA* chez les souches CFT073 Δ lac, CFT073 Δ lac Δ oxyR et CFT073 Δ lac Δ fur transformées du vecteur pIJ232 sur un milieu solide M9-glucose. * $p < 0,02$.

Les résultats obtenus sur milieu minimal M9-glucose démontrent une augmentation de l'expression de *sitA* en présence de H₂O₂ pour toutes les souches. Cependant, il est possible de remarquer que la souche CFT073 Δ lac Δ oxyR montre une expression plus élevée que la souche CFT073 Δ lac Δ fur, contrairement aux conditions en milieu riche LB.

3.3.2 Surexpression et solubilisation de OxyR

Afin d'étudier plus en profondeur le rôle d'OxyR dans la régulation du promoteur du gène *sitA*, un test d'interaction de la protéine et du promoteur en question a été réalisé. Tout d'abord, la protéine OxyR a été surexprimée à l'aide du plasmide pJW3933. Afin de vérifier la solubilité de la protéine OxyR surexprimée, une vérification par immunobuvardage de type Western a été effectuée, à l'aide de la sonde *HisProbe*TM-HRP (section 2.9.4).

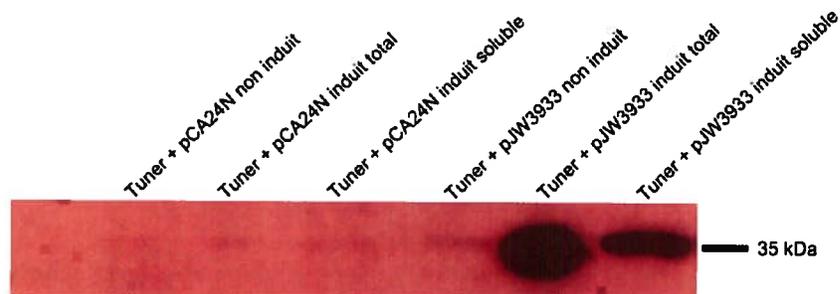


Figure 3.18 : Immunobuvardage de type Western confirmant la solubilité de la protéine OxyR. La sonde *HisProbe*TM-HRP a été utilisée afin de visualiser la protéine OxyR. Le poids moléculaire de la protéine est indiqué à droite de la figure (35kDa). La fraction soluble constitue le surnageant obtenu après sonication des bactéries induites.

Afin de s'assurer de la spécificité de l'induction, un contrôle négatif consistant en la souche Tuner transformée avec le plasmide pCA24N a été utilisée. Ce dernier constitue le plasmide vide utilisé afin de surexprimer OxyR. La figure 3.18 démontre qu'il n'y a pas d'induction d'OxyR pour la souche contenant le plasmide seulement. En effet, on retrouve un résultat identique à la souche non induite. Par contre, pour la souche avec le plasmide inductible contenant le gène codant pour la protéine OxyR, l'induction par l'IPTG montre une grande surexpression de la protéine. Cependant, l'extrait total induit démontre une plus grande quantité d'OxyR, dû à la formation de corps d'inclusions. De plus, il est possible de remarquer qu'une bonne partie de la protéine est soluble. Cet extrait de protéine a donc été utilisé lors des expériences d'interaction ultérieures.

3.3.3 Interaction entre *p_{sitA}* et OxyR

Par la suite, des tests d'interaction entre la protéine OxyR et le promoteur du gène *sitA* ont été effectués à l'aide d'une microcolonne permettant le contact entre le fragment d'ADN présentant le promoteur et l'extrait de protéines. Les protéines adhérentes au promoteur ont par la suite pu être récoltées. Ces tests visaient la vérification directe de la liaison entre la protéine et le promoteur. Les résultats sont présentés aux figures 3.19 et 3.20. Afin de s'assurer de la consistance des résultats obtenus, deux contrôles supplémentaires ont été ajoutés. En effet, des tests d'interaction utilisant les promoteurs des gènes *katG* et *lacZ* ont été utilisés respectivement comme contrôle positif et négatif.

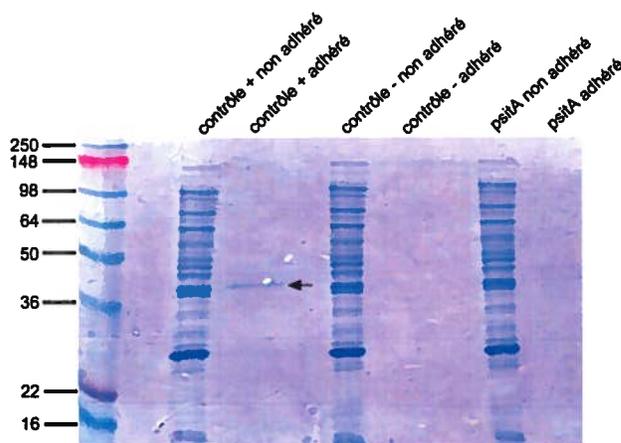


Figure 3.19 : Gel d'acrylamide montrant les interactions de la protéine OxyR et des différents promoteurs utilisés. Le contrôle positif (contrôle +) constitue le promoteur du gène *katG*, alors que le contrôle négatif (contrôle -) constitue le promoteur du gène *lacZ*. Les poids moléculaires (kDa) sont inscrits à gauche de la figure. La flèche indique la protéine OxyR récoltée après élution des protéines adhérentes à la colonne.

Tout d'abord, on remarque que l'extrait de protéines solubles obtenu comporte plusieurs protéines, expliquant le nombre élevé de bandes retrouvé dans les échantillons non adhérents à la colonne d'interaction. De plus, les résultats présentés à la figure précédente montrent la présence sur le gel d'acrylamide d'une bande d'environ 35 kDa pour le contrôle positif (*katG*), correspondant à la protéine OxyR. En effet, un séquençage utilisant la spectrométrie de masse a permis de confirmer l'identité de la protéine retrouvée dans cette bande. Cependant, aucune protéine n'a été récoltée pour le contrôle négatif (*lacZ*) correspondant au poids moléculaire d'OxyR. De plus, il est possible de remarquer qu'il n'y a aucune interaction entre la protéine OxyR et le promoteur du gène *sitA*. En effet, aucune bande ne peut être observée correspondant à OxyR. Donc, aucune protéine n'a adhéré au promoteur de *sitA*.

La figure 3.20 montre un immunobuvardage de type Western réalisé à l'aide des mêmes échantillons que la figure précédente. Cette expérience consistait en une vérification supplémentaire de la présence de OxyR dans l'extrait soluble et de l'identité de la protéine recueillie lors du test d'interaction d'OxyR avec le promoteur *katG*.

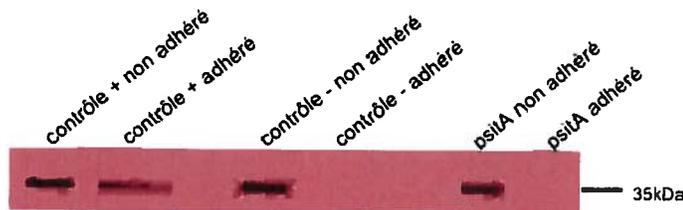
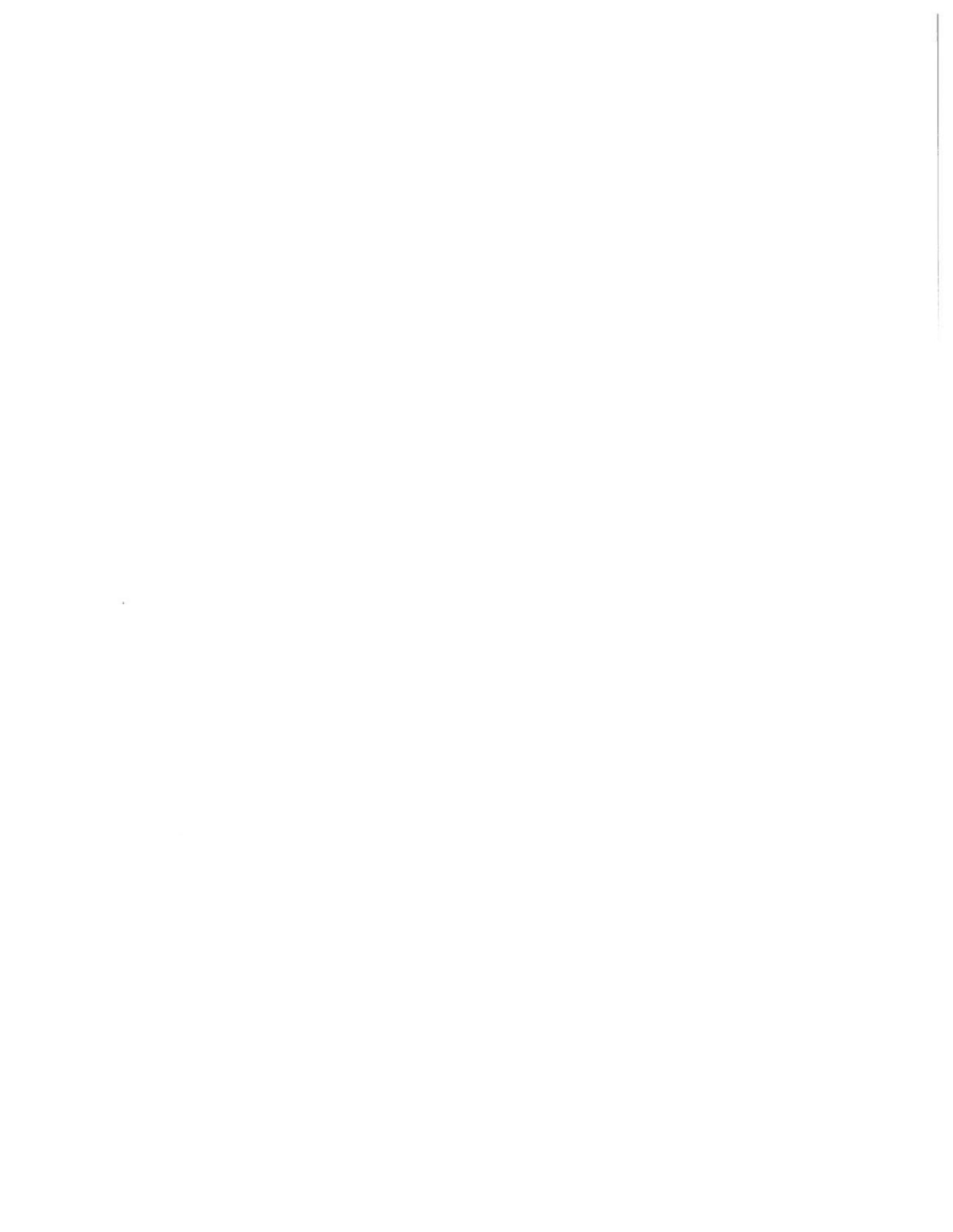


Figure 3.20 : Immunobuvardage de type Western confirmant l'interaction de la protéine OxyR. La sonde *HisProbeTM-HRP* a été utilisée afin de visualiser la protéine OxyR. Les contrôles non adhérents constituent les protéines n'ayant pas adhérentes au promoteur présent dans la colonne d'interaction. Le poids moléculaire de la protéine est indiqué à droite de la figure (35kDa).

Les résultats obtenus confirment les observations de la figure 3.19 (gel). En effet, il est possible de remarquer que les trois échantillons non adhérents présentent la protéine OxyR. Cependant, seul le contrôle positif *katG* montre la présence de la protéine OxyR adhérent à son promoteur. Ceci suggère encore une fois que la protéine OxyR ne se lie pas au promoteur *sitA*.



Chapitre 4. Discussion

4.1 Coinfections du tractus urinaire des souris

Un modèle d'infection de souris a été utilisé afin de vérifier le rôle du système SitABCD pour la virulence de la souche d'*E. coli* uropathogène CFT073. L'inoculum initial contenait, dans la plupart des cas, un nombre égal de cellules provenant des deux souches testées en coinfection (Tableau 3.1). Aussi, tous les contrôles de stérilité effectués avant l'infection (urine) nous ont assurés que les souris n'étaient pas infectées préalablement à l'inoculation des bactéries. De plus, les contrôles de stérilité effectués à la surface des organes suite à l'infection nous ont démontrés que les souris n'avaient pas développés de septicémie, ce qui aurait pu fausser les résultats lors du dénombrement du nombre de bactéries retrouvées dans les organes.

Nous avons tout d'abord réalisé une coinfection mettant en compétition les souches CFT073 sauvage et CFT073 Δlac . Cette étape visait à déterminer si la mutation effectuée dans le gène *lac* affectait la capacité de la souche à établir une infection urinaire chez la souris. En effet, l'utilisation de la souche isogénique CFT073 Δlac permettait d'obtenir un moyen rapide et direct de différencier entre cette souche et les différents mutants testés. Cette technique a déjà été utilisée chez d'autres groupes de recherche. En effet, le groupe de recherche de Welch utilise celle-ci afin de faciliter la détection de chacune des souches de CFT073 (Anfora *et al.*, 2007; Haugen *et al.*, 2007). Comme aucune différence au niveau de la colonisation des organes et de la capacité à établir l'infection urinaire chez la souris n'a été observée entre les souches CFT073 sauvage et CFT073 Δlac (Figure 3.1), cette dernière a été utilisée pour les expériences ultérieures.

Par la suite, le mutant CFT073 $\Delta sitABCD$ a été inoculé en coinfection avec la souche CFT073 Δlac et testé dans le modèle murin. Comme mentionné précédemment, aucune différence significative au niveau de la capacité à infecter n'a été observée entre les deux souches, tant au niveau de la vessie que des reins (Figure 3.2). Ces résultats suggèrent que la perte du système SitABCD seul ne cause pas de perte de virulence chez la souche CFT073. Ces résultats étaient quelque peu surprenant puisque une étude chez cette même

souche avait démontré que les gènes *sitABCD* sont induits dans l'urine de souris lors d'une infection du tractus urinaire ou lors de croissance dans l'urine humaine *in vitro* (Snyder *et al.*, 2004). De plus, l'infection de cellules avec *Shigella flexneri* montrait aussi une induction de l'expression des gènes *sitABCD* (Lucchini *et al.*, 2005; Runyen-Janecky et Payne, 2002). Ces résultats suggéraient donc une importance pour la virulence du système SitABCD, ce qui n'a pas été observé avec les résultats que nous avons obtenus.

Cette importance pour la virulence a été démontrée chez certaines souches. En effet, dans un modèle de coinfection chez le poulet utilisant la souche pathogène aviaire χ 7122, un mutant Δ *sitABCD* montrait une baisse significative de virulence dans les organes (poumons, rate et foie), la souche mutée n'étant pas en mesure de coloniser les organes aussi bien que la souche parentale (Sabri *et al.*, 2008). Chez *S. Typhimurium*, l'infection intrapéritonéale de souris avec la souche contenant la mutation du gène *sitA* seulement causait aussi une légère baisse de virulence, c'est-à-dire que les souris survivaient un peu plus longtemps que des souris ayant été infectées avec la souche sauvage (Zaharik *et al.*, 2004). Les mêmes résultats ont été obtenus lors d'injection intraveineuse avec un mutant Δ *sitABCD* de *S. Typhimurium* (Boyer *et al.*, 2002).

L'une des meilleures explications de ces différences au niveau de la virulence serait le modèle utilisé. En effet, les deux études mentionnées précédemment présentaient des conditions différentes. La première étude portait sur un modèle chez le poulet qui causait une infection de type respiratoire et septicémique. Un décompte bactérien a été effectué afin d'évaluer la survie et prolifération des différentes souches. Les organes récoltés, c'est-à-dire les poumons, la rate et le foie, étaient différents des infections urinaires, où ce sont la vessie et les reins qui sont prélevés. Il est possible que l'environnement des différents organes soit différent et qu'un système essentiel pour la survie et la prolifération dans un organe ne le soit pas dans un autre. Dans le cas de la deuxième étude, les bactéries étaient administrées intrapéritonéalement et la virulence des différentes souches était évaluée par le pourcentage de survie des souris. Il était donc question d'une infection générale causant la mort des souris. De plus, *S. Typhimurium* possède un cycle d'infection et de réplication intracellulaire à l'intérieur des

macrophages, ce qui n'est pas le cas avec une infection causée par *E. coli*. Dans le cas de notre modèle, aucune infection générale n'a été détectée, celle-ci se limitant au tractus urinaire. Les conditions de stress auxquelles les bactéries étaient exposées étaient donc complètement différentes, ce qui pourrait expliquer les changements d'importance au niveau de la virulence. Il est aussi à noter que les souches bactériennes utilisées étaient différentes : la souche APEC χ 7122 et *S. Typhimurium*. L'importance d'un système peut varier d'une souche à une autre dépendamment des autres facteurs de virulence que celles-ci possèdent.

Ensuite, le mutant CFT073 $\Delta mntH$ a été inoculé en coinfection avec la souche CFT073 Δlac et testé dans le modèle murin. Aucune différence significative au niveau de la capacité à infecter n'a été observée entre les deux souches, tant au niveau de la vessie que des reins, tout comme pour la souche CFT073 $\Delta sitABCD$ (Figure 3.3). Ceci suggère que la perte du système MntH seul ne cause pas de perte de virulence chez la souche CFT073. Ces résultats sont en accord avec les résultats qui avaient été obtenus pour la souche APEC χ 7122. En effet, aucune différence au niveau de la capacité à coloniser les organes n'avait été observée pour un mutant *mntH* (Sabri *et al.*, 2008). Par contre, les résultats obtenus chez *S. Typhimurium* démontraient, selon la route d'infection, une légère baisse de virulence lors de la perte du gène *mntH* (intrapéritonéalement) et aucun changement lors d'injection intraveineuse (Boyer *et al.*, 2002; Zaharik *et al.*, 2004). Il semble encore une fois y avoir des différences dépendamment du modèle d'infection et de l'espèce utilisé.

Finalement, le mutant CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ a été inoculé en coinfection avec la souche CFT073 Δlac et testé dans le modèle murin. Une différence significative de colonisation a été observée au niveau des reins (Figure 3.4). En effet, la souche CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ était présente en moins grande proportion (cinq fois moins) par rapport à la souche CFT073 Δlac dans les reins. Cette différence n'a cependant pas été observée dans la vessie. Il semble donc que la présence de l'un des deux systèmes, SitABCD ou MntH, soit essentielle à la pleine virulence de la souche CFT073 lors de la colonisation

des reins. La perte d'un seul des systèmes n'ayant pas d'effet notable, on pourrait donc penser qu'il se complémente.

Des résultats semblables ont été obtenus récemment chez la souche APEC $\chi 7122$. Comme mentionné précédemment, le simple mutant $\chi 7122 \Delta sitABCD$ était atténué dans le modèle aviaire, tandis que le mutant $\chi 7122 \Delta mntH$ n'était aucunement affecté. En ce qui a trait au double mutant $\chi 7122 \Delta sitABCD \Delta mntH$, il était atténué dans le modèle aviaire (Sabri *et al.*, 2008). De plus, chez *S. Typhimurium*, une baisse de virulence importante suite à une infection intraveineuse (Boyer *et al.*, 2002) et une perte totale de virulence suite à une infection intrapéritonéale ont été observées (Zaharik *et al.*, 2004). Bien que l'effet que nous avons observé soit moins important, il est tout de même présent et concorde avec les résultats obtenus par ces autres groupes. Nos résultats suggèrent, dans le modèle d'infection du tractus urinaire, que l'un des deux systèmes, SitABCD ou MntH, est suffisant pour assurer à la bactérie une bonne colonisation des reins et l'établissement de l'infection à ce niveau. Chacun peut prendre la relève en l'absence de l'autre. Cependant, lorsque les deux sont absents, la bactérie est moins en mesure d'établir une infection dans les reins. De plus, il semble que le rein est un environnement plus stressant que la vessie, puisque aucune différence au niveau de la colonisation n'est observée entre le mutant et la souche parentale dans la vessie.

4.2 Sensibilité au stress oxydatif

Comme mentionné à la section 3.2, la région promoteur de l'opéron *sitABCD* présente une séquence putative de liaison pour la protéine OxyR (Figure 3.5) (Kehres *et al.*, 2002a). Pour cette raison, nous avons voulu étudier le rôle de SitABCD dans la résistance au stress oxydatif. Les différents mutants ont donc été testés afin de déterminer leur sensibilité à différents agents causant différents types de stress oxydatifs. Chaque agent a tout d'abord été testé avec les souches K-12 servant de contrôle : JWK3933 ($\Delta oxyR$), JWK4024 ($\Delta soxR$) et JWK4023 ($\Delta soxS$). Cette étape a permis d'évaluer plus spécifiquement quel type de stress était en cause pour chaque produit. En effet, OxyR

constitue le régulateur de la réponse au stress oxydatif de type H_2O_2 . Il contrôle un ensemble de gènes impliqués dans la détoxification du H_2O_2 (Pomposiello et Demple, 2001). Dans le cas des protéines SoxR et SoxS, ces dernières contrôlent un ensemble de gènes permettant à la bactérie de résister au stress oxydatif de type anion superoxyde (Pomposiello et Demple, 2001). Donc, les souches mutantes pour ces deux systèmes devraient être plus sensibles aux agents générant les stress respectifs pour lesquels elles contrôlent la réponse. Ce phénomène a déjà été observé chez la souche Ec1a, causant aussi des infections urinaires. En effet, la délétion du gène *oxyR* augmentait la sensibilité de la souche au H_2O_2 (Johnson *et al.*, 2006).

Dans le cas du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), les contrôles K-12 ont démontrés une plus grande sensibilité de la souche $\Delta oxyR$, tant sur milieu riche que sur milieu minimal, confirmant le type de stress auquel les bactéries sont exposées (Figure 3.6). Par la suite, les différents mutants (CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$, CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$) ont aussi été testés avec le H_2O_2 . À la figure 3.7, il est possible de remarquer qu'aucune différence de sensibilité n'est visible sur milieu riche (LB). Cependant, sur milieu minimal (M9-glucose), on remarque que le mutant CFT073 $\Delta mntH$ est un peu plus sensible que la souche sauvage. De plus, le mutant CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ est encore plus sensible au H_2O_2 .

Des résultats un peu différents ont été obtenus pour la souche pathogène aviaire $\chi 7122$. En effet, sur milieu LB la souche $\chi 7122 \Delta sitABCD\Delta mntH$ était plus sensible que la souche sauvage. Par contre, sur milieu M9-glucose, le mutant $\chi 7122 \Delta mntH$ ainsi que le double mutant $\chi 7122 \Delta sitABCD\Delta mntH$ était plus sensible au H_2O_2 que la souche sauvage, résultats identiques à ceux que nous avons obtenus (Sabri *et al.*, 2008). De plus, une étude réalisée par Runyen-Janecky et ses collaborateurs avait présentée des résultats semblables pour un mutant $\Delta sitA\Delta mntH$ chez la souche *Shigella flexneri*, c'est-à-dire une plus grande sensibilité que la souche sauvage au H_2O_2 , tant sur milieu riche (LB) que sur milieu T, ressemblant au milieu M9-glucose supplémenté de thymidine et tryptophane (Simon et Tessman, 1963). Cependant, un simple mutant $\Delta mntH$ n'avait démontré aucune différence de sensibilité sur ces deux milieux (Runyen-Janecky *et al.*, 2006). Cette

différence pourrait s'expliquer tout simplement par le fait que les deux souches étudiées sont différentes et le rôle de chacun des transporteurs peut être différent d'une souche à l'autre.

Dans le cas de la plumbagine, les tests effectués en utilisant les contrôles K-12 ont démontrés que les composés causant le stress était tant le H_2O_2 que le O_2^- . En effet, les mutants $\Delta oxyR$, $\Delta soxR$ et $\Delta soxS$ sont tous sensibles à la plumbagine, suggérant que celle-ci produit ces deux composés (Figure 3.8). Dans le cas des mutants CFT073 $\Delta sitABCD$, CFT073 $\Delta mntH$, CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$, on observe le même phénomène que lors des tests utilisant le H_2O_2 , c'est-à-dire que le mutant $\Delta mntH$ est plus sensible que la souche sauvage, alors que le mutant $\Delta sitABCD\Delta mntH$ est encore plus sensible (Figure 3.9).

L'étude réalisée chez la souche $\chi 7122$ donnait des résultats quelque peu différents de ce que nous avons obtenu. En effet, sur milieu LB, le mutant $\Delta sitABCD\Delta mntH$ était plus sensible que la souche sauvage, ce que nous n'avons pas observé chez la souche CFT073. Dans le cas du milieu M9-glucose, seul le mutant $\Delta sitABCD\Delta mntH$ montrait une plus grande sensibilité, au contraire de nos résultats qui mettaient en évidence une légère hausse de sensibilité chez le mutant CFT073 $\Delta mntH$ aussi (Sabri *et al.*, 2008). Encore une fois, les différentes souches utilisées pourraient expliquer ces différences.

Pour les tests effectués avec la phénazine méthosulfate et la phénazine éthosulfate, les contrôles effectués avec les souches K-12 ont montré une plus grande sensibilité pour les mutants $\Delta soxR$ et $\Delta soxS$ (Figures 3.10 et 3.12). Donc, le stress généré serait plutôt de type superoxyde (O_2^-). Dans le cas des souches dérivées de CFT073 (CFT073 $\Delta mntH$, CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$), on observe très peu d'effet au niveau de la sensibilité. En effet, sur milieu riche (LB), ces deux produits ne causent aucun changement dans la sensibilité des différentes souches (Figures 3.11 et 3.13). Sur milieu minimal (M9-glucose), le double mutant CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ montre une très légère hausse de sensibilité à la phénazine méthosulfate (Figure 3.11), alors qu'aucun changement n'est observé lors de l'ajout de phénazine éthosulfate (Figure 3.13).

Dans le cas de la souche $\chi 7122$, le double mutant $\Delta sitABCD\Delta mntH$ montrait une augmentation de sa sensibilité à la phénazine méthosulfate sur milieu riche et minimal (Sabri *et al.*, 2008). De plus, chez *S. flexneri*, aucune différence n'avait été observée au niveau de la sensibilité à la phénazine méthosulfate pour les mêmes mutants (Runyen-Janecky *et al.*, 2006).

Les résultats présentés démontrent donc que la perte des systèmes SitABCD et MntH rend la souche plus sensible à un certain nombre d'agents générant des espèces réactives de l'oxygène, particulièrement sur un milieu minimal. Chez plusieurs bactéries, la présence de transporteurs de manganèse a été associée à la capacité de ces espèces de mieux résister au H_2O_2 et superoxyde (Horsburgh *et al.*, 2002). Comme démontré chez *S. Typhimurium* (Boyer *et al.*, 2002), *S. flexneri* (Runyen-Janecky *et al.*, 2006) et la souche APEC $\chi 7122$ (Sabri *et al.*, 2008), le double mutant CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ est plus sensible au H_2O_2 . De plus, le mutant CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ est sensible à un autre agent, la plumbagine. Ce composé génère du superoxyde, mais ce dernier peut être transformé en H_2O_2 grâce à l'action des SODs présentes dans la cellule bactérienne. L'utilisation des mutants K-12 $\Delta oxyR$, $\Delta soxR$ et $\Delta soxS$, qui étaient tous plus sensibles à la plumbagine que la souche sauvage, suggère que l'apparition de H_2O_2 se produit bel et bien suite à l'exposition à ce produit. Au contraire, l'exposition à la phénazine méthosulfate et la phénazine éthosulfate n'a produit aucune différence de sensibilité pour le mutant CFT073 $\Delta sitABCD\Delta mntH$ et le mutant K-12 $\Delta oxyR$. Ces résultats suggèrent donc un rôle orienté plus vers la résistance au H_2O_2 pour ces deux systèmes.

Les différences de sensibilité aux différents agents peuvent probablement s'expliquer par leurs différents mécanismes d'action pour générer du stress oxydatif ou encore d'autres effets toxiques. En effet, chez *E. coli*, la réponse au stress générée par la phénazine méthosulfate est considérablement différente de la réponse générée par la plumbagine. De plus, comme mentionné précédemment, l'exposition à la phénazine méthosulfate produit une haute activité de la catalase et peu d'activité des SODs, alors que l'exposition à la plumbagine augmente l'activité des deux mécanismes de résistance au stress oxydatif

(Hassan et Fridovich, 1979; Schwartz *et al.*, 1983). Il est donc normal d'observer différents résultats pour des produits générant différents types de stress.

Il est aussi possible de constater que la souche CFT073 en général est plus résistante que la souche K-12 utilisée. Étant donné que la taille du génome de CFT073 est supérieure à celle de K-12 (5,23 Mb versus 4,64 Mb), il est évident que la souche CFT073 a acquis des gènes supplémentaires que la souche K-12 ne possède pas (Welch *et al.*, 2002). Parmi ces gènes, plusieurs facteurs de virulence ou de résistance tels que des structures de surface (capsule, LPS, systèmes d'efflux, protéines de la membrane externe, etc.) sont présents et pourraient permettre à la souche clinique de mieux résister au stress oxydatif.

En général, les souches étudiées sont plus résistantes aux agents générant des stress oxydatifs sur milieu riche que sur milieu minimal. Ce phénomène pourrait être expliqué par la composition différentielle des deux milieux. Le milieu LB constitue un milieu non défini, c'est-à-dire que la composition exacte de celui-ci n'est pas connue, ainsi que la concentration de chaque élément contenu. Cependant, plusieurs composants organiques sont présents en grande quantité. Pour sa part, le milieu M9-glucose est un milieu défini, dont toutes les concentrations des différentes substances sont connues. Il est possible que lors des tests de sensibilité sur milieu solide LB, les produits générateurs de stress appliqués au centre de la gélose, au moment de leur diffusion, soient inactivés par les composés organiques. Ils auraient donc moins d'effet sur les bactéries en croissance et seraient moins toxiques. De plus, une plus grande concentration de métaux comme le manganèse est disponible sur un milieu riche. Donc, l'importance des transporteurs de métaux comme SitABCD et MntH sera possiblement moins critique pour la résistance au stress oxydatif.

En regard des ces tests, le système MntH semble plus important chez la souche CFT073 afin de résister au stress oxydatif *in vitro*. De plus, Kehres et ses collaborateurs ont démontré, chez *S. Typhimurium*, que SitABCD transportait le Mn^{2+} dans des conditions légèrement alcaline, tandis que MntH transportait plus efficacement le Mn^{2+} à des pH acides (Kehres *et al.*, 2002b). Les deux transporteurs auraient donc des rôles

physiologiques distinctifs. Il est donc possible que lors des tests sur géloses, le milieu de croissance des bactéries ait été un peu plus acide, et que dans ces conditions, MntH se soit révélé plus important pour le transport de Mn^{2+} . Cependant, lors des coinfections réalisées à l'aide du modèle d'infection du tractus urinaire ascendante, il semblerait que les conditions rencontrées par les bactéries permettaient un fonctionnement adéquat des deux systèmes (SitABCD et MntH), puisque la perte de l'un ou l'autre n'affectait pas la capacité de la souche à coloniser les organes et survivre dans ces derniers.

4.3 Régulation de *p**sitA* par OxyR

Suite aux tests de sensibilité aux différents composés générant différents stress oxydatifs, le système SitABCD semblait impliqué dans la résistance au H_2O_2 . Nous avons donc voulu étudié le rôle d'OxyR, régulateur de la réponse au H_2O_2 , dans la régulation de *sitABCD*. Pour ce faire, des vecteurs fusionnant le promoteur *sitA* au gène *lacZ* ont été construits : pIJ221, un vecteur à moyen nombre de copies et pIJ232 un vecteur d'intégration. Des tests en milieu LB liquide ont tout d'abord été effectués avec différentes souches (CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$) contenant les deux plasmides afin d'évaluer l'expression du promoteur de *sitA*.

À la figure 3.14, les résultats pour les souches transformées avec le plasmide pIJ221 sont présentés. Il est possible de remarquer que la souche CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ présente une expression de *sitA* beaucoup plus élevée que les souches CFT073 Δlac et CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$. Ceci est probablement dû au fait que le gène *fur* régule négativement *sitABCD*. En effet, chez *S. Typhimurium*, il a été découvert que l'opéron *sitABCD* est réprimé par MntR et Fur (Ikeda *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 1999). Étant donné que Fur est un répresseur, il est logique que lorsque muté, donc absent, les gènes réprimés ne le soit plus. C'est ce même phénomène qui est observé avec *sitABCD*. Lorsque *fur* est absent, on remarque une augmentation de l'expression. On remarque le même phénomène aux figures 3.15 et 3.16.

La figure 3.15 montre les résultats obtenus pour les souches transformées avec le vecteur d'intégration pIJ232 en milieu liquide LB. Comme mentionné précédemment, il est possible de remarquer que le niveau de base d'expression de *sitA* est différent pour les trois souches, CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$. En effet, en présence des deux protéines OxyR et Fur, le niveau reste assez bas. Par contre, lorsque OxyR est absent, on remarque une augmentation de l'expression en général et une plus grande augmentation encore lorsque Fur est absent. Ces résultats suggèrent qu'OxyR jouerait possiblement le rôle d'un régulateur négatif et qu'en son absence, l'expression des gènes *sitABCD* sera plus élevée.

La figure 3.16 montre les mêmes souches que la figure 3.15, mais cette fois, le test a été effectué sur gélose LB. Cette expérience confirme les résultats obtenus à la figure 3.15, puisqu'on remarque toujours un niveau d'expression de *sitA* plus élevé en absence d'OxyR et un niveau encore plus élevé en absence de Fur. Cependant, les niveaux d'unités Miller semblent en général être plus élevés sur gélose qu'en milieu solide. Ceci pourrait être expliqué par le fait que sur gélose, les conditions rencontrées par les bactéries sont différentes de celles rencontrées en milieu liquide. En effet, lors de la croissance sur gélose, les bactéries semblent rencontrer plus de stress oxydatif qu'en milieu liquide (Cuny *et al.*, 2007). De plus, lors de la croissance sur gélose, les régulateurs OxyR et SoxRS sont induits, ce qui suggère une augmentation du stress oxydatif. La protéine Fur aussi est induite lors de croissance sur gélose. Donc, les niveaux d'unités Miller plus élevés observés sont possiblement dus au fait que les bactéries sont exposées à un plus grand stress oxydatif (Cuny *et al.*, 2007). De plus, les cellules se retrouvant en phase stationnaire de croissance sont confrontées à un environnement plus stressant en termes de nutriments et stress oxydatif comparativement à des cellules en phase logarithmique de croissance. SitABCD étant impliqué dans le transport de Mn^{2+} , il aurait un rôle possible dans la défense contre ce stress oxydatif et serait donc plus induit.

Finalement, la figure 3.17 montre les résultats obtenus pour les souches CFT073 Δlac , CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$ et CFT073 $\Delta lac\Delta fur$ transformée avec pIJ232, mais ayant poussées sur milieu solide minimal M9-glucose. On remarque sur cette figure que le niveau d'expression de *sitA* chez la souche manquant Fur (CFT073 $\Delta lac\Delta fur$) est revenu

pratiquement au niveau de la souche manquant OxyR (CFT073 $\Delta lac\Delta oxyR$), mais les deux sont toujours plus élevé que la souche CFT073 Δlac . La fonction principale de Fur est de contrôler le transport de fer à l'intérieur de la cellule. Lorsque la concentration intracellulaire est suffisante, Fur est activé et réprime plusieurs gènes impliqués dans le transport de fer (Andrews *et al.*, 2003). Lorsque la bactérie croît dans un milieu riche, le fer et plusieurs métaux sont présents en grande quantité pour la bactérie. Celle-ci doit donc réguler l'entrée de fer, afin de ne pas causer plus de stress que nécessaire. Étant donné que Fur est un répresseur de *sitABCD* (Ikeda *et al.*, 2005), en son absence, comme mentionné précédemment, *sitABCD* n'est pas réprimé et est donc plus exprimé. C'est ce que l'on observait aux figures 3.14, 3.15 et 3.16. Cependant, en milieu minimal, le fer et autres métaux ne sont pas présents en grande quantité et les systèmes de transport de fer ne sont pas réprimés par Fur. Donc, l'absence de Fur lors de la croissance sur milieu minimal affecte moins l'expression de *sitA* puisque même s'il était présent, il ne réprimerait pas le promoteur.

Pour toutes les figures montrant les résultats des essais de dosage de la β -galactosidase, il est possible d'observer une augmentation de l'expression du promoteur *sitA* en présence de H_2O_2 (Figure 3.14, 3.15, 3.16 et 3.17). La présence de H_2O_2 semblerait donc avoir un effet sur l'expression du système SitABCD. Cependant, même en absence d'OxyR, une induction de l'expression du promoteur peut être observée. Il est à noter que les résultats obtenus lors des essais dosant la β -galactosidase pourraient être dus à la régulation de *fur* par OxyR. En effet, il a été démontré que le gène *fur* est activé par les régulateurs OxyR et SoxRS (Zheng *et al.*, 1999). Donc, en absence d'OxyR, il est possible que l'expression de Fur soit moins activée, et ainsi réprimera moins *sitA*. On observerait donc une augmentation de l'expression de *sitA* dû à un effet indirect d'OxyR sur Fur.

Afin de s'assurer que l'effet observé lors de l'ajout de H_2O_2 était dû directement à OxyR ou à un effet indirect par Fur, nous avons voulu tester l'interaction directe entre le promoteur *sitA* et la protéine OxyR. Pour ce faire, la protéine OxyR a été surexprimée et la fraction soluble a été utilisée pour la réalisation du test d'interaction. À la figure 3.18, il

est possible de constater qu'une bonne fraction de la protéine surexprimée est soluble. Cette étape s'est avérée une vérification nécessaire puisque l'interaction entre la protéine et le promoteur ne pouvait s'effectuer qu'en milieu aqueux. Par la suite, le test d'interaction a été effectué. Aucune interaction n'a été observée entre le promoteur de *sitA* et la protéine OxyR, comme le montre les figures 3.19 et 3.20. Par contre, on voit que le contrôle positif utilisant le promoteur de *katG* a permis de détecter la liaison de la protéine OxyR. Il est donc possible de conclure que ces résultats suggèrent que la protéine OxyR ne se lie pas directement au promoteur de *sitA*, et donc ne régule pas de façon directe le système SitABCD.

Suite à ces résultats, il semblerait donc que l'effet observé d'augmentation de l'expression de *sitA* en présence de H₂O₂ ne serait pas dû directement à l'activation par OxyR. Comme mentionné précédemment, la plus grande expression de *sitA* en absence d'OxyR pourrait être dû à une réduction de l'expression de *fur*, ce qui mènerait à une augmentation de l'expression de *sitABCD*.

De plus, plusieurs études ont démontré que certains gènes étaient toujours induits en absence de SoxRS et OxyR, suggérant la présence d'autres régulateurs répondant au stress oxydatif généré par le H₂O₂. Par exemple, une étude a révélé qu'une proportion significative de gènes induits par le superoxyde sont indépendants de SoxRS (Greenberg *et al.*, 1990; Pomposiello *et al.*, 2001). Le gène *hmp*, codant pour la flavohaemoglobine, est induit par le paraquat et l'oxyde nitrique indépendamment de SoxRS (Membrillo-Hernandez *et al.*, 1997; Poole *et al.*, 1996). Par ailleurs, on sait que la plupart des gènes induits par le H₂O₂ sont régulés par OxyR. Cependant, certains gènes sont toujours induits par le H₂O₂ même en absence de ce régulateur ou de SoxRS, suggérant la présence d'autres régulateurs répondant au stress oxydatif causé par le H₂O₂ (Zheng *et al.*, 2001). De plus, ce phénomène a aussi été observé chez un autre système présent chez *E. coli*, l'opéron *sufABCDSE*. Le système Suf joue un rôle important dans des conditions de stress, telles le manque de fer ou la présence de stress oxydatif. En effet, Lee et ses collaborateurs ont démontré que *sufA* est induit par des produits générant du superoxyde et du H₂O₂. De plus, cette induction n'était pas médiée par SoxRS et était plus importante

en absence de ce régulateur. Il serait donc possible que le même phénomène soit existant pour le système SitABCD, c'est-à-dire que d'autres régulateurs encore inconnus soient impliqués dans la régulation du système lors de la présence de stress oxydatif (Lee *et al.*, 2004).

Les résultats obtenus ont donc permis l'étude du rôle du système SitABCD pour la virulence de la souche UPEC CFT073, lors d'ITUs dans le modèle de la souris. De plus, le rôle dans la défense contre le stress oxydatif ainsi que la régulation du système a pu être étudié. Ces résultats permettent de mieux comprendre les différents événements qui ont lieu dans le tractus urinaire. Une analyse plus complète de la régulation de l'opéron SitABCD permettra de mieux comprendre la régulation du système face au stress oxydatif, ainsi que les différents régulateurs qui pourraient y jouer un rôle.

Conclusion

Il a été démontré précédemment chez quelques espèces bactériennes que le système SitABCD est important pour la virulence et la résistance au stress oxydatif, et ce dans différents modèles. Or, l'importance du système dans le modèle d'infections du tractus urinaire ascendantes, ainsi que son importance pour contrer le stress oxydatif rencontré dans ce milieu n'avait jamais été étudié. Ce projet de recherche reposait donc sur l'étude du rôle du système SitABCD chez la souche d'*E. coli* uropathogène CFT073 causant des infections du tractus urinaire. Trois volets ont été explorés au cours de cette étude. Tout d'abord, nous avons déterminé le rôle du système SitABCD pour la virulence de la souche CFT073. Par la suite, nous avons déterminé son rôle dans la résistance au stress oxydatif causé par plusieurs produits chimiques. Finalement, la régulation du système a été étudiée suite à une exposition au peroxyde d'hydrogène et le rôle du régulateur de la réponse au H₂O₂, OxyR, a été évalué.

Plusieurs conclusions peuvent être tirées suite à ce travail sur l'étude du rôle du transporteur SitABCD, ainsi que sa régulation, pour la virulence et la résistance au stress oxydatif de la souche uropathogène CFT073. Tout d'abord, il a été démontré que le système SitABCD est important pour la virulence de la souche, seulement lors de la perte simultanée du système MntH, ces deux systèmes possédant possiblement un rôle complémentaire. Par ailleurs, il a été établi que la perte de ces deux systèmes simultanément entraîne une augmentation de la sensibilité de la souche CFT073 au stress oxydatif, semblant être plus associée au peroxyde d'hydrogène. L'implication d'OxyR dans la régulation du système a finalement été étudiée. Malgré l'observation de l'augmentation de l'expression du promoteur de *sitA* en présence de H₂O₂ à l'aide de tests de dosage de la β -galactosidase, aucune interaction spécifique entre la protéine OxyR et le promoteur *sitA* n'a été observée. Ces résultats ont donc suggéré que la présence des deux systèmes SitABCD et MntH est nécessaire pour la virulence complète de la souche UPEC CFT073 et la résistance au stress oxydatif. De plus, malgré que l'ajout de H₂O₂ augmente l'expression du promoteur *sitA*, la protéine OxyR ne semble pas directement

impliquée dans la régulation de ce dernier. Ceci suggère la présence possible d'autres régulateurs inconnus régulant les gènes *sitABCD* en présence de H₂O₂.

Plusieurs questions restent encore en suspens et maintes expériences seront nécessaires afin d'y répondre. Par exemple, il serait intéressant de tenter de découvrir ces régulateurs encore inconnus impliqués dans l'activation des gènes *sitABCD* lors de la présence d'un stress causé par le H₂O₂. De plus, la mutation simultanée de plusieurs régulateurs, tels OxyR, Fur et MntR, permettrait d'étudier l'effet cumulatif de ces derniers sur l'expression de SitABCD. Finalement, il serait intéressant d'étudier l'effet de la modification de certaines bases dans la région promoteur de *sitA* sur la régulation de l'expression du système SitABCD.

Références

- Altuvia, S., M. Almiron, G. Huisman, R. Kolter et G. Storz.** 1994. «The *dps* promoter is activated by OxyR during growth and by IHF and sigma S in stationary phase». Mol Microbiol, vol. 13, no. 2, p. 265-272.
- Altuvia, S., A. Zhang, L. Argaman, A. Tiwari et G. Storz.** 1998. «The *Escherichia coli* OxyS regulatory RNA represses *fhlA* translation by blocking ribosome binding». Embo J, vol. 17, no. 20, p. 6069-6075.
- Amabile-Cuevas, C. F., et B. Demple.** 1991. «Molecular characterization of the *soxRS* genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon». Nucleic Acids Res, vol. 19, no. 16, p. 4479-4484.
- 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. 424-430.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson et F. Rodriguez-Quinones.** 2003. «Bacterial iron homeostasis». FEMS Microbiol Rev, vol. 27, no. 2-3, p. 215-237.
- Anfora, A. T., B. J. Haugen, P. Roesch, P. Redford et R. A. Welch.** 2007. «Roles of serine accumulation and catabolism in the colonization of the murine urinary tract by *Escherichia coli* CFT073». Infect Immun, vol. 75, no. 11, p. 5298-5304.
- Arosio, P., et S. Levi.** 2002. «Ferritin, iron homeostasis, and oxidative damage». Free Radic Biol Med, vol. 33, no. 4, p. 457-463.
- Bagg, A., et J. B. Neilands.** 1987. «Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*». Biochemistry, vol. 26, no. 17, p. 5471-5477.
- Bauer, R. J., L. Zhang, B. Foxman, A. Siitonen, M. E. Jantunen, H. Saxen et C. F. Marrs.** 2002. «Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-*usp*, *iha*, and *iron*(*E. coli*)». J Infect Dis, vol. 185, no. 10, p. 1521-1524.
- Baumler, A. J., T. L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch et F. Heffron.** 1998. «IronN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*». J Bacteriol, vol. 180, no. 6, p. 1446-1453.
- Baumler, A. J., R. M. Tsolis, A. W. van der Velden, I. Stojiljkovic, S. Anic et F. Heffron.** 1996. «Identification of a new iron regulated locus of *Salmonella typhi*». Gene, vol. 183, no. 1-2, p. 207-213.

- Bearden, S. W., et R. D. Perry.** 1999. «The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague». Mol Microbiol, vol. 32, no. 2, p. 403-414.
- Benjamin, W. H., Jr., C. L. Turnbough, Jr., B. S. Posey et D. E. Briles.** 1985. «The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid». Infect Immun, vol. 50, no. 2, p. 392-397.
- Bergsten, G., B. Wullt et C. Svanborg.** 2005. «*Escherichia coli*, fimbriae, bacterial persistence and host response induction in the human urinary tract». Int J Med Microbiol, vol. 295, no. 6-7, p. 487-502.
- Bister, B., D. Bischoff, G. J. Nicholson, M. Valdebenito, K. Schneider, G. Winkelmann, K. Hantke et R. D. Sussmuth.** 2004. «The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*». Biometals, vol. 17, no. 4, p. 471-481.
- Boyd, E. F., et D. L. Hartl.** 1998. «Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution». J Bacteriol, vol. 180, no. 5, p. 1159-1165.
- 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. 6032-6042.
- Braun, V., et M. Braun.** 2002. «Iron transport and signaling in *Escherichia coli*». FEBS Lett, vol. 529, no. 1, p. 78-85.
- Cellier, M., A. Belouchi et P. Gros.** 1996. «Resistance to intracellular infections: comparative genomic analysis of Nramp». Trends Genet, vol. 12, no. 6, p. 201-204.
- Cellier, M. F., I. Bergevin, E. Boyer et E. Richer.** 2001. «Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters». Trends Genet, vol. 17, no. 7, p. 365-370.
- Chaniotaki, S., P. Giakouppi, L. S. Tzouveleakis, D. Panagiotakos, M. Kozanitou, G. Petrikos, A. Avlami et A. C. Vatopoulos.** 2004. «Quinolone resistance among *Escherichia coli* strains from community-acquired urinary tract infections in Greece». Clin Microbiol Infect, vol. 10, no. 1, p. 75-78.
- Chen, J. W., C. M. Sun, W. L. Sheng, Y. C. Wang et W. J. Syu.** 2006. «Expression Analysis of Up-Regulated Genes Responding to Plumbagin in *Escherichia coli*». J Bacteriol, vol. 188, no. 2, p. 456-463.
- Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson et B. N. Ames.** 1985. «Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*». Cell, vol. 41, no. 3, p. 753-762.
- Christman, M. F., G. Storz et B. N. Ames.** 1989. «OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, is

homologous to a family of bacterial regulatory proteins». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 86, no. 10, p. 3484-3488.

Clermont, O., S. Bonacorsi et E. Bingen. 2001. «The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli*». FEMS Microbiol Lett, vol. 196, no. 2, p. 153-157.

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. 9827-9832.

Costerton, J. W., P. S. Stewart et E. P. Greenberg. 1999. «Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections». Science, vol. 284, no. 5418, p. 1318-1322.

Courville, P., R. Chaloupka, F. Veyrier et M. F. Cellier. 2004. «Determination of transmembrane topology of the *Escherichia coli* natural resistance-associated macrophage protein (Nramp) ortholog». J Biol Chem, vol. 279, no. 5, p. 3318-3326.

Cowart, R. E. 2002. «Reduction of iron by extracellular iron reductases: implications for microbial iron acquisition». Arch Biochem Biophys, vol. 400, no. 2, p. 273-281.

Crosa, J. H., et C. T. Walsh. 2002. «Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria». Microbiol Mol Biol Rev, vol. 66, no. 2, p. 223-249.

Cuny, C., M. Lesbats et S. Dukan. 2007. «Induction of a global stress response during the first step of *Escherichia coli* plate growth». Appl Environ Microbiol, vol. 73, no. 3, p. 885-889.

Datsenko, K. A., et B. L. Wanner. 2000. «One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 12, p. 6640-6645.

Davies, B. W., et G. C. Walker. 2007a. «Disruption of *sitA* compromises *Sinorhizobium meliloti* for manganese uptake required for protection against oxidative stress». J Bacteriol, vol. 189, no. 5, p. 2101-2109.

Davies, B. W., et G. C. Walker. 2007b. «Identification of novel *Sinorhizobium meliloti* mutants compromised for oxidative stress protection and symbiosis». J Bacteriol, vol. 189, no. 5, p. 2110-2113.

de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero et J. B. Neilands. 1987. «Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor». J Bacteriol, vol. 169, no. 6, p. 2624-2630.

Denstedt, J. D., T. A. Wollin et G. Reid. 1998. «Biomaterials used in urology: current issues of biocompatibility, infection, and encrustation». J Endourol, vol. 12, no. 6, p. 493-500.

- Desrosiers, D. C., Y. C. Sun, A. A. Zaidi, C. H. Eggers, D. L. Cox et J. D. Radolf.** 2007. «The general transition metal (Tro) and Zn²⁺ (Znu) transporters in *Treponema pallidum*: analysis of metal specificities and expression profiles». Mol Microbiol, vol. 65, no. 1, p. 137-152.
- Diderichsen, B.** 1980. «*flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*». J Bacteriol, vol. 141, no. 2, p. 858-867.
- Donlan, R. M., et J. W. Costerton.** 2002. «Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms». Clin Microbiol Rev, vol. 15, no. 2, p. 167-193.
- Donnenberg, M. S., et R. A. Welch.** 1996. «Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*». In Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management, p. 135-174. Washington DC.: ASM Press.
- Dozois, C. M., et R. Curtiss, 3rd.** 1999. «Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream». Vet Res, vol. 30, no. 2-3, p. 157-179.
- Faraldo-Gomez, J. D., et M. S. Sansom.** 2003. «Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria». Nat Rev Mol Cell Biol, vol. 4, no. 2, p. 105-116.
- Fexby, S., T. Bjarnsholt, P. O. Jensen, V. Roos, N. Hoiby, M. Givskov et P. Klemm.** 2007. «Biological Trojan horse: Antigen 43 provides specific bacterial uptake and survival in human neutrophils». Infect Immun, vol. 75, no. 1, p. 30-34.
- Fierer, J., L. Talner et A. I. Braude.** 1971. «Bacteremia in the pathogenesis of retrograde *E. coli* pyelonephritis in the rat». Am J Pathol, vol. 64, no. 2, p. 443-456.
- Foxman, B.** 1990. «Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors». Am J Public Health, vol. 80, no. 3, p. 331-333.
- Foxman, B.** 2002. «Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs». Am J Med, vol. 113 Suppl 1A, no., p. 5S-13S.
- 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. 509-515.
- Gaudu, P., N. Moon et B. Weiss.** 1997. «Regulation of the *soxRS* oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR *in vivo*». J Biol Chem, vol. 272, no. 8, p. 5082-5086.
- Gerchman, Y., Y. Olami, A. Rimon, D. Taglicht, S. Schuldiner et E. Padan.** 1993. «Histidine-226 is part of the pH sensor of NhaA, a Na⁺/H⁺ antiporter in *Escherichia coli*». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 90, no. 4, p. 1212-1216.

- Goetz, D. H., M. A. Holmes, N. Borregaard, M. E. Bluhm, K. N. Raymond et R. K. Strong.** 2002. «The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition». Mol Cell, vol. 10, no. 5, p. 1033-1043.
- Gransden, W. R., S. J. Eykyn, I. Phillips et B. Rowe.** 1990. «Bacteremia due to *Escherichia coli*: a study of 861 episodes». Rev Infect Dis, vol. 12, no. 6, p. 1008-1018.
- Greenberg, J. T., P. Monach, J. H. Chou, P. D. Josephy et B. Demple.** 1990. «Positive control of a global antioxidant defense regulon activated by superoxide-generating agents in *Escherichia coli*». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 87, no. 16, p. 6181-6185.
- Gruenheid, S., et P. Gros.** 2000. «Genetic susceptibility to intracellular infections: Nramp1, macrophage function and divalent cations transport». Curr Opin Microbiol, vol. 3, no. 1, p. 43-48.
- Gruer, M. J., et J. R. Guest.** 1994. «Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (AcnA and AcnB) in *Escherichia coli*». Microbiology, vol. 140 (Pt 10), no., p. 2531-2541.
- Gunshin, H., B. Mackenzie, U. V. Berger, Y. Gunshin, M. F. Romero, W. F. Boron, S. Nussberger, J. L. Gollan et M. A. Hediger.** 1997. «Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter». Nature, vol. 388, no. 6641, p. 482-488.
- Gupta, K., D. Scholes et W. E. Stamm.** 1999. «Increasing prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in women». Jama, vol. 281, no. 8, p. 736-738.
- 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. 4539-4546.
- Gyles, C. L.** 1994. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford: CAB International, xv, 666 p.
- Hacker, J., et J. B. Kaper.** 2000. «Pathogenicity islands and the evolution of microbes». Annu Rev Microbiol, vol. 54, no., p. 641-679.
- Hagberg, L., I. Engberg, R. Freter, J. Lam, S. Olling et C. Svanborg Eden.** 1983a. «Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin». Infect Immun, vol. 40, no. 1, p. 273-283.

Hagberg, L., R. Hull, S. Hull, S. Falkow, R. Freter et C. Svanborg Eden. 1983b. «Contribution of adhesion to bacterial persistence in the mouse urinary tract». Infect Immun, vol. 40, no. 1, p. 265-272.

Hanahan, D., J. Jessee et F. R. Bloom. 1991. «Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria». Methods Enzymol, vol. 204, no., p. 63-113.

Hancock, V., L. Ferrieres et P. Klemm. 2008. «The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine». Microbiology, vol. 154, no. Pt 1, p. 167-175.

Hantke, K. 2001. «Iron and metal regulation in bacteria». Curr Opin Microbiol, vol. 4, no. 2, p. 172-177.

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

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

Hassan, H. M. 1988. «Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases». Free Radic Biol Med, vol. 5, no. 5-6, p. 377-385.

Hassan, H. M., et I. Fridovich. 1979. «Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds». Arch Biochem Biophys, vol. 196, no. 2, p. 385-395.

Haugen, B. J., S. Pellett, P. Redford, H. L. Hamilton, P. L. Roesch et R. A. Welch. 2007. «*In vivo* gene expression analysis identifies genes required for enhanced colonization of the mouse urinary tract by uropathogenic *Escherichia coli* strain CFT073 *dsdA*». Infect Immun, vol. 75, no. 1, p. 278-289.

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. 593-597.

Henderson, I. R., et J. P. Nataro. 2001. «Virulence functions of autotransporter proteins». Infect Immun, vol. 69, no. 3, p. 1231-1243.

Henderson, I. R., F. Navarro-Garcia et J. P. Nataro. 1998. «The great escape: structure and function of the autotransporter proteins». Trends Microbiol, vol. 6, no. 9, p. 370-378.

Henderson, I. R., et P. Owen. 1999. «The major phase-variable outer membrane protein of *Escherichia coli* structurally resembles the immunoglobulin A1 protease class of

exported protein and is regulated by a novel mechanism involving Dam and oxyR». J Bacteriol, vol. 181, no. 7, p. 2132-2141.

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

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

Hilali, F., R. Ruimy, P. Saulnier, C. Barnabe, C. Lebouguenec, M. Tibayrenc et A. Andreumont. 2000. «Prevalence of virulence genes and clonality in *Escherichia coli* strains that cause bacteremia in cancer patients». Infect Immun, vol. 68, no. 7, p. 3983-3989.

Hooton, T. M. 2003. «Fluoroquinolones and resistance in the treatment of uncomplicated urinary tract infection». Int J Antimicrob Agents, vol. 22 Suppl 2, no., p. 65-72.

Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, M. Karavolos et S. J. Foster. 2002. «Manganese: elemental defence for a life with oxygen». Trends Microbiol, vol. 10, no. 11, p. 496-501.

Hultgren, S. J., T. N. Porter, A. J. Schaeffer et J. L. Duncan. 1985. «Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 50, no. 2, p. 370-377.

Ikeda, J. S., A. Janakiraman, D. G. Kehres, M. E. Maguire et J. M. Slauch. 2005. «Transcriptional regulation of *sitABCD* of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by MntR and Fur». J Bacteriol, vol. 187, no. 3, p. 912-922.

Imlay, J. A. 2003. «Pathways of oxidative damage». Annu Rev Microbiol, vol. 57, no., p. 395-418.

Jabado, N., A. Jankowski, S. Dougaparsad, V. Picard, S. Grinstein et P. Gros. 2000. «Natural resistance to intracellular infections: natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) functions as a pH-dependent manganese transporter at the phagosomal membrane». J Exp Med, vol. 192, no. 9, p. 1237-1248.

Janakiraman, A., et J. M. Slauch. 2000. «The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*». Mol Microbiol, vol. 35, no. 5, p. 1146-1155.

Johnson, D. E., et R. G. Russell. 1996. «Animal models of urinary tract infection». In Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management, p. 377-403. Washington DC.: ASM Press.

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., C. Clabots et H. Rosen. 2006. «Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator *oxyR* on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection». Infect Immun, vol. 74, no. 1, p. 461-468.

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. 965-971.

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. 2249-2251.

Johnson, J. R., A. C. Murray, M. A. Kuskowski, S. Schubert, M. F. Prere, B. Picard, R. Colodner et R. Raz. 2005b. «Distribution and characteristics of *Escherichia coli* clonal group A». Emerg Infect Dis, vol. 11, no. 1, p. 141-145.

Johnson, J. R., K. Owens, A. Gajewski et M. A. Kuskowski. 2005c. «Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women». J Clin Microbiol, vol. 43, no. 12, p. 6064-6072.

Justice, S. S., C. Hung, J. A. Theriot, D. A. Fletcher, G. G. Anderson, M. J. Footer et S. J. Hultgren. 2004. «Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 101, no. 5, p. 1333-1338.

Kalivoda, K. A., K. I. Braun et E. R. Vimr. 2003. «Rapid purification of a prokaryotic regulatory protein with uMACS Streptavidin MicroBeads», p. 24-25. Miltenyi Biotec, Californie.

Kallenius, G., R. Mollby, S. B. Svenson, I. Helin, H. Hultberg, B. Cedergren et J. Winberg. 1981. «Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in urinary tract infections». Lancet, vol. 2, no. 8260-61, p. 1369-1372.

Kaper, J. B., J. P. Nataro et H. L. Mobley. 2004. «Pathogenic *Escherichia coli*». Nat Rev Microbiol, vol. 2, no. 2, p. 123-140.

Keele, B. B., Jr., J. M. McCord et I. Fridovich. 1970. «Superoxide dismutase from *Escherichia coli* B. A new manganese-containing enzyme». J Biol Chem, vol. 245, no. 22, p. 6176-6181.

Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Slauch et M. E. Maguire. 2002a. «Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺». J Bacteriol, vol. 184, no. 12, p. 3151-3158.

- Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Slauch et M. E. Maguire.** 2002b. «SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium». J Bacteriol, vol. 184, no. 12, p. 3159-3166.
- Kehres, D. G., et M. E. Maguire.** 2003. «Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria». FEMS Microbiol Rev, vol. 27, no. 2-3, p. 263-290.
- Kehres, D. G., M. L. Zaharik, B. B. Finlay et M. E. Maguire.** 2000. «The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen». Mol Microbiol, vol. 36, no. 5, p. 1085-1100.
- Keyer, K., A. S. Gort et J. A. Imlay.** 1995. «Superoxide and the production of oxidative DNA damage». J Bacteriol, vol. 177, no. 23, p. 6782-6790.
- Keyer, K., et J. A. Imlay.** 1996. «Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 24, p. 13635-13640.
- Kitagawa, M., T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga et H. Mori.** 2005. «Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research». DNA Res, vol. 12, no. 5, p. 291-299.
- Klemm, P., L. Hjerrild, M. Gjermansen et M. A. Schembri.** 2004. «Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*». Mol Microbiol, vol. 51, no. 1, p. 283-296.
- Kuijpers, T. W., et D. Roos.** 2004. «Neutrophils: The power within». In The Innate Immune Response to Infection, p. 47-70. Washington DC.: ASM Press.
- Landraud, L., M. Gauthier, T. Fosse et P. Boquet.** 2000. «Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections». Lett Appl Microbiol, vol. 30, no. 3, p. 213-216.
- Landraud, L., C. Pulcini, P. Gounon, G. Flatau, P. Boquet et E. Lemichez.** 2004. «*E. coli* CNF1 toxin: a two-in-one system for host-cell invasion». Int J Med Microbiol, vol. 293, no. 7-8, p. 513-518.
- Lavrrar, J. L., C. A. Christoffersen et M. A. McIntosh.** 2002. «Fur-DNA interactions at the bidirectional fepDGC-entS promoter region in *Escherichia coli*». J Mol Biol, vol. 322, no. 5, p. 983-995.
- Lee, J. H., W. S. Yeo et J. H. Roe.** 2004. «Induction of the *sufA* operon encoding Fe-S assembly proteins by superoxide generators and hydrogen peroxide: involvement of OxyR, IHF and an unidentified oxidant-responsive factor». Mol Microbiol, vol. 51, no. 6, p. 1745-1755.

- Léveillé, S., M. Caza, J. R. Johnson, C. Clabots, M. Sabri et C. M. Dozois.** 2006. «Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed *in vivo* in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor». Infect Immun, vol. 74, no. 6, p. 3427-3436.
- Liochev, S. I., et I. Fridovich.** 1992. «Fumarase C, the stable fumarase of *Escherichia coli*, is controlled by the *soxRS* regulon». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 89, no. 13, p. 5892-5896.
- Litwin, C. M., et S. B. Calderwood.** 1993. «Role of iron in regulation of virulence genes». Clin Microbiol Rev, vol. 6, no. 2, p. 137-149.
- Loewen, P. C., J. Switala et B. L. Triggs-Raine.** 1985. «Catalases HPI and HPII in *Escherichia coli* are induced independently». Arch Biochem Biophys, vol. 243, no. 1, p. 144-149.
- Lucchini, S., H. Liu, Q. Jin, J. C. Hinton et J. Yu.** 2005. «Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen». Infect Immun, vol. 73, no. 1, p. 88-102.
- Lymberopoulos, M. H., S. Houle, F. Daigle, S. Léveillé, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, J. R. Johnson et C. M. Dozois.** 2006. «Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract». J Bacteriol, vol. 188, no. 18, p. 6449-6459.
- 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. 1007-1013.
- Marrs, C. F., L. Zhang et B. Foxman.** 2005. «*Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?». FEMS Microbiol Lett, vol. 252, no. 2, p. 183-190.
- Martinez, A., et R. Kolter.** 1997. «Protection of DNA during oxidative stress by the nonspecific DNA-binding protein Dps». J Bacteriol, vol. 179, no. 16, p. 5188-5194.
- Masse, E., H. Salvail, G. Desnoyers et M. Arguin.** 2007. «Small RNAs controlling iron metabolism». Curr Opin Microbiol, vol. 10, no. 2, p. 140-145.
- Membrillo-Hernandez, J., S. O. Kim, G. M. Cook et R. K. Poole.** 1997. «Paraquat regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12 is SoxRS independent but modulated by sigma S». J Bacteriol, vol. 179, no. 10, p. 3164-3170.
- Mey, A. R., E. E. Wyckoff, A. G. Oglesby, E. Rab, R. K. Taylor et S. M. Payne.** 2002. «Identification of the *Vibrio cholerae* enterobactin receptors VctA and IrgA: IrgA is not required for virulence». Infect Immun, vol. 70, no. 7, p. 3419-3426.

- Miller, J. H.** 1992. A short course in bacterial genetics : a laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 v. p.
- Mills, M., K. C. Meysick et A. D. O'Brien.** 2000. «Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism». Infect Immun, vol. 68, no. 10, p. 5869-5880.
- Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockatell, B. D. Jones et J. W. Warren.** 1990. «Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains». Infect Immun, vol. 58, no. 5, p. 1281-1289.
- Montgomerie, J. Z., A. Bindereif, J. B. Neilands, G. M. Kalmanson et L. B. Guze.** 1984. «Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia». Infect Immun, vol. 46, no. 3, p. 835-838.
- Muller, K., B. F. Matzanke, V. Schunemann, A. X. Trautwein et K. Hantke.** 1998. «FhuF, an iron-regulated protein of *Escherichia coli* with a new type of [2Fe-2S] center». Eur J Biochem, vol. 258, no. 3, p. 1001-1008.
- Mulvey, M. A.** 2002. «Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*». Cell Microbiol, vol. 4, no. 5, p. 257-271.
- Mulvey, M. A., Y. S. Lopez-Boado, C. L. Wilson, R. Roth, W. C. Parks, J. Heuser et S. J. Hultgren.** 1998. «Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*». Science, vol. 282, no. 5393, p. 1494-1497.
- Nevo, Y., et N. Nelson.** 2006. «The NRAMP family of metal-ion transporters». Biochim Biophys Acta, vol. 1763, no. 7, p. 609-620.
- Novagen.** 2002. pET System Manual. 10e édition. Canada, 68 p.
- Nowicki, B. J.** 1996. «*In vitro* models for the study of uropathogens». In Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management, p. 341-376. Washington, DC.: ASM Press.
- 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. 690-693.

- Oswald, E., M. Sugai, A. Labigne, H. C. Wu, C. Fiorentini, P. Boquet et A. D. O'Brien.** 1994. «Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by virulent *Escherichia coli* modifies the small GTP-binding proteins Rho involved in assembly of actin stress fibers». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 91, no. 9, p. 3814-3818.
- Owen, P.** 1992. «The gram-negative outer membrane: structure, biochemistry and vaccine potential». Biochem Soc Trans, vol. 20, no. 1, p. 1-6.
- Papp-Wallace, K. M., et M. E. Maguire.** 2006. «Manganese transport and the role of manganese in virulence». Annu Rev Microbiol, vol. 60, no., p. 187-209.
- 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.
- Patzer, S. I., et K. Hantke.** 2001. «Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*». J Bacteriol, vol. 183, no. 16, p. 4806-4813.
- Picard, B., J. S. Garcia, S. Gouriou, P. Duriez, N. Brahimi, E. Bingen, J. Elion et E. Denamur.** 1999. «The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection». Infect Immun, vol. 67, no. 2, p. 546-553.
- Pierce.** 2005. «Instructions: HisProbe-HRP», Nepean.
- Pomposiello, P. J., M. H. Bennik et B. Demple.** 2001. «Genome-wide transcriptional profiling of the *Escherichia coli* responses to superoxide stress and sodium salicylate». J Bacteriol, vol. 183, no. 13, p. 3890-3902.
- Pomposiello, P. J., et B. Demple.** 2001. «Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors». Trends Biotechnol, vol. 19, no. 3, p. 109-114.
- Poole, R. K., M. F. Anjum, J. Membrillo-Hernandez, S. O. Kim, M. N. Hughes et V. Stewart.** 1996. «Nitric oxide, nitrite, and Fnr regulation of hmp (flavo-hemoglobin) gene expression in *Escherichia coli* K-12». J Bacteriol, vol. 178, no. 18, p. 5487-5492.
- 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. 4426-4428.
- Prescott, L. M., J. P. Harley et D. A. Klein.** 1995. Microbiologie. Bruxelles: De Boeck-Wesmael, xxxii, 1014 p.
- Rae, T. D., P. J. Schmidt, R. A. Pufahl, V. C. Culotta et T. V. O'Halloran.** 1999. «Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase». Science, vol. 284, no. 5415, p. 805-808.

- Ratledge, C., et L. G. Dover.** 2000. «Iron metabolism in pathogenic bacteria». Annu Rev Microbiol, vol. 54, no., p. 881-941.
- Restieri, C., G. Garriss, M. C. Locas et C. M. Dozois.** 2007. «Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains». Appl Environ Microbiol, vol. 73, no. 5, p. 1553-1562.
- 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. 11889-11893.
- Robinson, N. J., C. M. Procter, E. L. Connolly et M. L. Guerinot.** 1999. «A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils». Nature, vol. 397, no. 6721, p. 694-697.
- Rocha, H.** 1963. «Experimental Pyelonephritis. Characteristics of the Infection in Dogs». Yale J Biol Med, vol. 36, no., p. 183-190.
- Rolfs, A., et M. A. Hediger.** 1999. «Metal ion transporters in mammals: structure, function and pathological implications». J Physiol, vol. 518 (Pt 1), no., p. 1-12.
- Ronald, A.** 2002. «The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens». Am J Med, vol. 113 Suppl 1A, no., p. 14S-19S.
- Roos, V., E. M. Nielsen et P. Klemm.** 2006a. «Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesins, growth and competition». FEMS Microbiol Lett, vol. 262, no. 1, p. 22-30.
- Roos, V., G. C. Ulett, M. A. Schembri et P. Klemm.** 2006b. «The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine». Infect Immun, vol. 74, no. 1, p. 615-624.
- Rossi, M. S., J. D. Fetherston, S. Letoffe, E. Carniel, R. D. Perry et J. M. Ghigo.** 2001. «Identification and characterization of the hemophore-dependent heme acquisition system of *Yersinia pestis*». Infect Immun, vol. 69, no. 11, p. 6707-6717.
- Runyen-Janecky, L., E. Dazenski, S. Hawkins et L. Warner.** 2006. «Role and regulation of the *Shigella flexneri* *sit* and MntH systems». Infect Immun, vol. 74, no. 8, p. 4666-4672.
- Runyen-Janecky, L. J., et S. M. Payne.** 2002. «Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment». Infect Immun, vol. 70, no. 8, p. 4379-4388.
- 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. 1919-1928.

- Russo, T., J. J. Brown, S. T. Jodush et J. R. Johnson.** 1996. «The O4 specific antigen moiety of lipopolysaccharide but not the K54 group 2 capsule is important for urovirulence of an extraintestinal isolate of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 64, no. 6, p. 2343-2348.
- Russo, T. A., U. B. Carlino et J. R. Johnson.** 2001. «Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 69, no. 10, p. 6209-6216.
- Russo, T. A., U. B. Carlino, A. Mong et S. T. Jodush.** 1999. «Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine». Infect Immun, vol. 67, no. 10, p. 5306-5314.
- Russo, T. A., et J. R. Johnson.** 2000. «Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC». J Infect Dis, vol. 181, no. 5, p. 1753-1754.
- Russo, T. A., et J. R. Johnson.** 2003. «Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem». Microbes Infect, vol. 5, no. 5, p. 449-456.
- Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard et J. R. Johnson.** 2002. «IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 70, no. 12, p. 7156-7160.
- Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd et C. M. Dozois.** 2008. «Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain χ 7122». Infect Immun, vol. 76, no. 2, p. 601-611.
- Sabri, M., S. Leveille et C. M. Dozois.** 2006. «A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide». Microbiology, vol. 152, no. Pt 3, p. 745-758.
- Sasmono, R. T., et D. A. Hume.** 2004. «The biology of macrophages». In The Innate Immune Response to Infection, p. 71-93. Washington DC.: ASM Press.
- Schaible, U. E., et S. H. Kaufmann.** 2004. «Iron and microbial infection». Nat Rev Microbiol, vol. 2, no. 12, p. 946-953.
- Schellhorn, H. E.** 1995. «Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*». FEMS Microbiol Lett, vol. 131, no. 2, p. 113-119.
- Schilling, J. D., M. A. Mulvey et S. J. Hultgren.** 2001. «Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections». J Infect Dis, vol. 183 Suppl 1, no., p. S36-40.

- Schubert, S., B. Picard, S. Gouriou, J. Heesemann et E. Denamur. 2002. «*Yersinia* high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections». Infect Immun, vol. 70, no. 9, p. 5335-5337.
- Schwartz, C. E., J. Krall, L. Norton, K. McKay, D. Kay et R. E. Lynch. 1983. «Catalase and superoxide dismutase in *Escherichia coli*». J Biol Chem, vol. 258, no. 10, p. 6277-6281.
- Selvarangan, R., P. Goluszko, V. Popov, J. Singhal, T. Pham, D. M. Lublin, S. Nowicki et B. Nowicki. 2000. «Role of decay-accelerating factor domains and anchorage in internalization of Dr-fimbriated *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 68, no. 3, p. 1391-1399.
- Simon, E. H., et I. Tessman. 1963. «Thymidine-Requiring Mutants of Phage T4». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 50, no., p. 526-532.
- Simons, R. W., F. Houman et N. Kleckner. 1987. «Improved single and multicopy lac-based cloning vectors for protein and operon fusions». Gene, vol. 53, no. 1, p. 85-96.
- Smith, Y. C., K. K. Grande, S. B. Rasmussen et A. D. O'Brien. 2006. «Novel three-dimensional organoid model for evaluation of the interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with terminally differentiated human urothelial cells». Infect Immun, vol. 74, no. 1, p. 750-757.
- Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockett, D. E. Johnson, M. S. Donnenberg, R. A. Welch et H. L. Mobley. 2004. «Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection». Infect Immun, vol. 72, no. 11, p. 6373-6381.
- Snyder, J. A., B. J. Haugen, C. V. Lockett, N. Maroncle, E. C. Hagan, D. E. Johnson, R. A. Welch et H. L. Mobley. 2005. «Coordinate expression of fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*». Infect Immun, vol. 73, no. 11, p. 7588-7596.
- Srinivasan, U., L. Zhang, A. M. France, D. Ghosh, W. Shalaby, J. Xie, C. F. Marrs et B. Foxman. 2007. «Probe hybridization array typing: a binary typing method for *Escherichia coli*». J Clin Microbiol, vol. 45, no. 1, p. 206-214.
- Stojiljkovic, I., A. J. Baumler et K. Hantke. 1994. «Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a *fur* titration assay». J Mol Biol, vol. 236, no. 2, p. 531-545.
- Storz, G., et S. Altuvia. 1994. «OxyR regulon». Methods Enzymol, vol. 234, no., p. 217-223.
- Storz, G., L. A. Tartaglia et B. N. Ames. 1990. «Transcriptional regulator of oxidative stress-inducible genes: direct activation by oxidation». Science, vol. 248, no. 4952, p. 189-194.

Storz, G., et M. Zheng. 2000. «Oxidative Stress». In Bacterial Stress Responses, p. 47-59. Washington DC.: ASM Press.

Stotter, L., M. Fischer, M. Stock, I. Braveny, U. Hagele, G. Grunberg et H. P. Schulze. 1975. «A new method for producing a chronic *E. coli* pyelonephritis in rabbits». Nephron, vol. 15, no. 6, p. 444-455.

Stromberg, N., B. I. Marklund, B. Lund, D. Ilver, A. Hamers, W. Gaastra, K. A. Karlsson et S. Normark. 1990. «Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal alpha 1-4Gal-containing isoreceptors». Embo J, vol. 9, no. 6, p. 2001-2010.

Stromberg, N., P. G. Nyholm, I. Pascher et S. Normark. 1991. «Saccharide orientation at the cell surface affects glycolipid receptor function». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 88, no. 20, p. 9340-9344.

Tao, K. 1997. «*oxyR*-dependent induction of *Escherichia coli* *grx* gene expression by peroxide stress». J Bacteriol, vol. 179, no. 18, p. 5967-5970.

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. 1400-1407.

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. 825-833.

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

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

Touati, D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard et S. Despied. 1995. «Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase». J Bacteriol, vol. 177, no. 9, p. 2305-2314.

Tsaneva, I. R., et B. Weiss. 1990. «*soxR*, a locus governing a superoxide response regulon in *Escherichia coli* K-12». J Bacteriol, vol. 172, no. 8, p. 4197-4205.

Ulett, G. C., J. Valle, C. Beloin, O. Sherlock, J. M. Ghigo et M. A. Schembri. 2007. «Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract». Infect Immun, vol. 75, no. 7, p. 3233-3244.

Valdebenito, M., B. Bister, R. Reissbrodt, K. Hantke et G. Winkelmann. 2005. «The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherichia coli* strains by a

novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method». Int J Med Microbiol, vol. 295, no. 2, p. 99-107.

Valdebenito, M., S. I. Muller et K. Hantke. 2007. «Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin)». FEMS Microbiol Lett, vol. 277, no. 2, p. 182-187.

Valle, J., S. Da Re, N. Henry, T. Fontaine, D. Balestrino, P. Latour-Lambert et J. M. Ghigo. 2006. «Broad-spectrum biofilm inhibition by a secreted bacterial polysaccharide». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 103, no. 33, p. 12558-12563.

von Baum, H., et R. Marre. 2005. «Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* and therapeutic implications». Int J Med Microbiol, vol. 295, no. 6-7, p. 503-511.

Warren, J. W. 1996. «Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections». In Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical management, p. 3-27. Washington, DC.: ASM Press.

Warren, J. W. 2001. «Catheter-associated urinary tract infections». Int J Antimicrob Agents, vol. 17, no. 4, p. 299-303.

Warren, J. W., H. L. Mobley, J. R. Hebel et A. L. Trifillis. 1995. «Cytolethality of hemolytic *Escherichia coli* to primary human renal proximal tubular cell cultures obtained from different donors». Urology, vol. 45, no. 4, p. 706-710.

Welch, R. A. 2006. «The Genus *Escherichia*». Prokaryotes, vol. 6, no. Chapitre 3.3.3, p. 60-71.

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. 17020-17024.

Whitfield, C., et I. S. Roberts. 1999. «Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*». Mol Microbiol, vol. 31, no. 5, p. 1307-1319.

Williams, P. H., W. Rabsch, U. Methner, W. Voigt, H. Tschape et R. Reissbrodt. 2006. «Catecholase receptor proteins in *Salmonella enterica*: role in virulence and implications for vaccine development». Vaccine, vol. 24, no. 18, p. 3840-3844.

Wu, J., et B. Weiss. 1991. «Two divergently transcribed genes, *soxR* and *soxS*, control a superoxide response regulon of *Escherichia coli*». J Bacteriol, vol. 173, no. 9, p. 2864-2871.

Yamamoto, S. 2007. «Molecular epidemiology of uropathogenic *Escherichia coli*». J Infect Chemother, vol. 13, no. 2, p. 68-73.

Yost, F. J., Jr., et I. Fridovich. 1973. «An iron-containing superoxide dismutase from *Escherichia coli*». J Biol Chem, vol. 248, no. 14, p. 4905-4908.

Yu, X., M. Susa, J. Weile, C. Knabbe, R. D. Schmid et T. T. Bachmann. 2007. «Rapid and sensitive detection of fluoroquinolone-resistant *Escherichia coli* from urine samples using a genotyping DNA microarray». Int J Med Microbiol, vol. 297, no. 6, p. 417-429.

Zaharik, M. L., V. L. Cullen, A. M. Fung, S. J. Libby, S. L. Kujat Choy, B. Coburn, D. G. Kehres, M. E. Maguire, F. C. Fang et B. B. Finlay. 2004. «The *Salmonella enterica* serovar typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an NramplG169 murine typhoid model». Infect Immun, vol. 72, no. 9, p. 5522-5525.

Zhang, A., S. Altuvia, A. Tiwari, L. Argaman, R. Hengge-Aronis et G. Storz. 1998. «The OxyS regulatory RNA represses *rpoS* translation and binds the Hfq (HF-I) protein». Embo J, vol. 17, no. 20, p. 6061-6068.

Zheng, M., F. Aslund et G. Storz. 1998. «Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation». Science, vol. 279, no. 5357, p. 1718-1721.

Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider et G. Storz. 1999. «OxyR and SoxRS regulation of *fur*». J Bacteriol, vol. 181, no. 15, p. 4639-4643.

Zheng, M., X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa et G. Storz. 2001. «DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide». J Bacteriol, vol. 183, no. 15, p. 4562-4570.

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

