

INRS-Institut Armand-Frappier

Distribution phylogénétique des gènes d'autotransporteurs chez *Escherichia coli*.

Par

Concetta Restieri

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maîtrise ès Sciences (M.Sc.) en
Microbiologie Appliquée

Jury d'évaluation

**Président du jury
et examinateur interne**

Pierre Juteau, INRS-Institut Armand-Frappier

Examinateur externe

**Serge Messier, DMV, PhD
Faculté de Médecine Vétérinaire
Université de Montréal**

Directeur de recherche

Charles M. Dozois, INRS-Institut Armand-Frappier

A nonna Concetta

Résumé

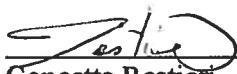
Escherichia coli est une bactérie faisant partie de la flore intestinale normale des humains et des animaux. Cependant, la diversité génétique de cette espèce confère à certaines souches la capacité de causer diverses maladies intestinales et extra-intestinales. L'espèce *E. coli* peut être classée selon différents critères. La classification par pathotype regroupe les souches qui provoquent le même type de maladie. L'espèce *E. coli* peut aussi être classée selon sa clonalité en quatre groupes phylogénétiques majeurs (A, B1, B2 et D).

Les autotransporteurs sont des protéines sécrétées par les bactéries Gram négatives ayant l'aptitude de diriger leur propre excrétion à travers la membrane externe. Ces protéines ont toutes la même structure générale mais possèdent différentes fonctions et/ou différents rôles pour la virulence. Les molécules d'autotransporteurs sont divisées en trois domaines : le domaine α ou N-terminal permet au précurseur protéique d'initier son transport à travers la membrane bactérienne interne ; le domaine passager confère la fonction à la protéine ; et finalement le domaine β ou C-terminal forme un pore à travers la membrane externe de la bactérie permettant au domaine passager d'être exporté vers le milieu externe. Le domaine passager peut soit être totalement relâché dans le milieu extracellulaire ou rester attaché à la membrane externe de la bactérie.

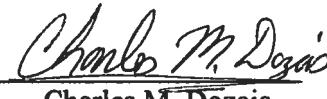
Au cours de ce projet, une méthode de PCR multiplexe a été développée afin d'améliorer la détection des séquences encodant les gènes de 13 autotransporteurs (*tsh*, *vat*, *sat*, *pic*, *espP*, *sigA*, *sepA*, *espC*, *eatA*, *pet*, *eaaA*, *agn43* et *aida-1*). Par la suite, la prévalence de ces séquences a été évaluée parmi des souches d'*E. coli* provenant de pathogenèse aviaire (APEC), d'infections urinaire humaines (UPEC), de maladies intestinales (IPEC) et la collection de référence ECOR. La localisation des gènes codant les autotransporteurs Tsh et Vat a aussi été examinée par hybridation de type Southern afin de déterminer s'ils sont encodés sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides de haut poids moléculaire.

Les résultats démontrent que la présence des gènes d'autotransporteurs est en général associée aux souches provenant des groupes phylogénétiques B2 et D, ce qui démontre une distribution phylogénétique de ces gènes. De plus, les souches provenant de ces

groupes sont reconnues pour être plus virulentes que les souches provenant des groupes A et B1, ce qui pourrait expliquer la présence plus accrue des gènes d'autotransporteurs parmi elles. Aussi, on dénote une distribution des gènes d'autotransporteurs selon le pathotype des souches étudiées. Finalement, parmi les souches testées, le gène *tsh* semble toujours être codé sur un plasmide alors que le gène *vat* serait toujours localisé sur le chromosome bactérien.



Concetta Restieri
Étudiante



Charles M. Dozois
Directeur de recherche

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier mon directeur de recherche Charles Dozois pour son accueil au laboratoire et pour m'avoir permis de participer à plusieurs congrès scientifiques nationaux et internationaux au cours de ma maîtrise. Merci à mes collègues de laboratoire Barbara Augustin, Mélissa Caza, Simon Léveillé et Maria Lymberopoulos pour leurs conseils et leur agréable compagnie. Merci aux stagiaires Geneviève Garriss et Marie-Claude Locas pour avoir effectué certaines expériences faisant parts de mon projet d'étude. Merci à Sébastien Houle et Annie Poirier pour leur disponibilité et leur aide. Merci à mes parents Leonardo et Chantal et à ma sœur Patricia pour leur soutien. Merci à mon amoureux Jean-François Bernier pour ses encouragements continuels. Merci aux filles des cinq doigts de la main Karine Boisvert, Geneviève Element, Marie-Élaine Gauvreau et Joannie Tremblay, sans vous je ne serais certainement pas allée si loin.

Merci à Pierre Juteau et Serge Messier pour avoir accepter de faire partie de mon jury d'évaluation et merci à la Fondation Armand-Frappier pour le support financier au cours de mes travaux.

Grazie mille,

Concetta Restieri

Table des matières

Résumé	v
Remerciements	vii
Table des matières	ix
Liste des figures	xi
Liste des tableaux	xiii
Liste des abréviations	xv
Introduction.....	1
Chapitre 1 : Revue de littérature.....	5
1.1 <i>Escherichia coli</i>.....	5
1.2 Les sérotypes.....	5
1.3 Les pathotypes	5
1.3.1 Les souches pathogènes intestinales (IPEC).....	6
1.3.1.1 <i>E. coli</i> entéropathogène (EPEC)	6
1.3.1.2 <i>E. coli</i> entérohémorragique (EHEC)	7
1.3.1.3 <i>E. coli</i> entérotoxigène (ETEC).....	7
1.3.1.4 <i>E. coli</i> entéroagrégative (EAEC)	8
1.3.1.5 <i>E. coli</i> entéroinvasive (EIEC)	8
1.3.1.6 <i>E. coli</i> à adhérence diffuse (DAEC).....	9
1.3.2 Les souches pathogènes extraintestinales (ExPEC).....	9
1.3.2.1 <i>E. coli</i> associées à la méningite néonatale et à la septicémie (MNEC)	9
1.3.2.2 <i>E. coli</i> uropathogène (UPEC)	10
1.3.2.3 <i>E. coli</i> pathogène aviaire (APEC)	11
1.4 Les groupes phylogénétiques	12
1.5 Les systèmes de sécrétion	15
1.5.1 Systèmes de sécrétion à travers la membrane cytoplasmique	15
1.5.1.1 Le système Sec.....	15
1.5.1.2 Le système SRP	16
1.5.1.3 Le système Tat	17
1.5.2 Systèmes de sécrétion à travers la membrane externe	18
1.5.2.1 Le système de sécrétion de type I (SSTU).....	20
1.5.2.2 Le système de sécrétion de type II (SSTD).....	20
1.5.2.3 Le système de sécrétion de type III (SSTT).....	21
1.5.2.4 Le système de sécrétion de type IV (SSTQ)	23
1.6 Autotransporteurs (ou système de sécrétion de type V).....	24
1.6.1 Le système d'autotransporteurs conventionnel (type Va)	25
1.6.1.1 Translocation à la membrane interne	26
1.6.1.2 Export à travers la membrane externe.....	26
1.6.1.3 Maturation à la surface de la bactérie	27
1.6.2 La voie de sécrétion à deux partenaires (type Vb).....	28
1.6.3 Les autotransporteurs trimériques (type Vc).....	28
1.6.4 Description de différents autotransporteurs	29
1.6.4.1 Les autotransporteurs de la famille AIDA	34
1.6.4.1.1 AIDA-I	34
1.6.4.1.2 Ag43.....	34

1.6.4.2 Les SPATEs	35
1.6.4.2.1 Tsh (Hbp)	36
1.6.4.2.2 Vat	36
1.6.4.2.3 Sat	37
1.6.4.2.4 Pic	37
1.6.4.2.5 SigA	38
1.6.4.2.6 SepA	38
1.6.4.2.7 EspP (PssA)	39
1.6.4.2.8 EspC	39
1.6.4.2.9 Pet	39
1.6.4.2.10 EaaA (EaaC)	40
1.6.4.2.11 EatA	40
Chapitre 2 : Article scientifique	41
2.1 Contribution des auteurs à l'article	41
2.1.1 Attestation des co-auteurs	42
2.2 Accusé de réception	44
2.3 Distribution of autotransporter genes among extraintestinal isolates of Escherichia coli and the ECOR-Collection	46
2.4 Résumé	47
2.5 Abstract	47
2.6 Introduction	48
2.7 Materials and Methods	51
2.8 Results	53
2.9 Discussion	58
2.10 Acknowledgments	64
2.11 References	64
2.12 Tables and figures	65
Chapitre 3 : Résultats supplémentaires	73
Chapitre 4 : Discussion	81
Chapitre 5 : Conclusion	87
ANNEXE 1	89
Résultats bruts du criblage de 491 souches d'E. coli pour la présence de différents gènes d'autotransporteurs	91
ANNEXE 2	109
Compilation des résultats bruts du criblage de 491 différentes souches d'E. coli pour 13 différents gènes d'autotransporteurs	111
ANNEXE 3	115
Compilation des résultats en pourcentages du criblage de 491 différentes souches d'E. coli pour 13 différents gènes d'autotransporteurs	117
Références	121

Liste des figures

Figure 1.1	Schéma de la pathogenèse intestinale d' <i>E. coli</i> .	7
Figure 1.2	Déterminants bactériens contribuant à la translocation d' <i>E. coli</i> à travers la barrière hématoencéphalique (BHE).	10
Figure 1.3	Représentation schématique des communautés bactériennes intracellulaires.	11
Figure 1.4	Distribution phylogénétique des 72 souches d' <i>E. coli</i> de la ECOR-Collection.	13
Figure 1.5	Évolution des groupes phylogénétiques d' <i>E. coli</i> .	14
Figure 1.6	Système de translocation Sec-dépendant chez <i>E. coli</i> .	16
Figure 1.7	Cycle fonctionnel du système SRP.	17
Figure 1.8	Mécanisme envisageable pour le système Tat.	18
Figure 1.9	Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion chez les bactéries Gram négatives.	19
Figure 1.10	Photo en microscopie électronique de complexes de seringues purifiés chez <i>Salmonella typhimurium</i> .	22
Figure 1.11	Représentation schématique des systèmes de sécrétion de type V.	25
Figure 1.12	Arbre phylogénétique des protéines autotransporteurs.	30
Figure 2.1	Schematic representation of the sequences encoding the five known variants of <i>agn43</i> and positions of the different primers used for the PCR assays.	65
Figure 2.2	Validation of PCR assay sets.	66
Figure 2.3	Distribution of SPATEs and <i>agn43</i> and allelic variants among the ECOR collection.	67
Figure 2.4	Prevalence of autotransporters in 491 <i>E. coli</i> strains.	68
Figure 2.5	Prevalence of autotransporters in 295 APEC strains previously classified for virulence based on lethality for 1-day-old chickens.	69

Figure 2.6	Typical results for Southern hybridization with the Tsh and Vat probes.	70
Figure 3.1	Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 491 souches d' <i>E. coli</i> .	71
Figure 3.2	Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 61 souches commensales d' <i>E. coli</i> provenant de l'ECOR-Collection.	72
Figure 3.3	Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 84 souches uropathogènes d' <i>E. coli</i> (UPEC).	73
Figure 3.4	Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 323 souches pathogènes aviaires d' <i>E. coli</i> (APEC).	74
Figure 3.5	Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 158 souches pathogènes aviaires d' <i>E. coli</i> (APEC) selon les différents sérogroupes.	75
Figure 3.6	Nombre moyen de gènes de SPATEs détectés par souche selon les différents groupes phylogénétiques chez 491 souches d' <i>E. coli</i> .	76
Figure 3.7	Nombre moyen de gènes de SPATEs détectés par souche selon les différents groupes pathospécifique chez 491 souches d' <i>E. coli</i> .	76
Figure 3.8	Nombre de variants d' <i>agn43</i> détectés par souche selon les différents groupes phylogénétiques chez 491 souches d' <i>E. coli</i> .	77
Figure 3.9	Nombre de variants d' <i>agn43</i> détectés par souche selon les différents groupes pathospécifiques chez 491 souches d' <i>E. coli</i> .	77

Liste des tableaux

Tableau 1.1	Fonctions de divers autotransporteurs.	31
Tableau 2.1	Primers for multiplex PCR and DNA probe synthesis.	63
Tableau 2.2	Distribution of the most common SPATE autotransporter sequences and <i>agn43</i> allelic variants among commensal, urinary tract and avian pathogenic <i>E. coli</i> isolates categorized by phylogenetic group.	64

Liste des abréviations

AAF	<i>Aggregative adherence fimbriae</i>
AAH	<i>Autotransporter adhesin heptosyl-transferase</i>
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
Ag43	<i>Antigen 43</i>
AIDA	<i>adhesin involved in diffuse adherence</i>
APEC	<i>Avian pathogenic <i>E. coli</i></i>
Bfp	<i>Bundle forming pilus</i>
BHE	<i>Barrière hémato encéphalique</i>
C	<i>Cystite</i>
CF	<i>Colonization factor</i>
CLT	<i>Chicken lethal factor</i>
CNF	<i>Cytotoxic necrotizing factor</i>
CT	<i>Cholera toxin</i>
DAEC	<i>Diffusely adhering <i>E. coli</i></i>
EAEC	<i>Enteropathogenic <i>E. coli</i></i>
ECOR-Collection	<i>E. coli Reference Collection</i>
EHEC	<i>Enterohaemoragic <i>E. coli</i></i>
EIEC	<i>Enteroinvasive <i>E. coli</i></i>
EPEC	<i>Enteropathogenic <i>E. coli</i></i>
EspP	<i>Extracellular serine protease plasmid-encoded</i>
EspC	<i>EPEC-secreted protein C</i>
ETEC	<i>Enterotoxigenic <i>E. coli</i></i>
ExPEC	<i>Extraintestinal pathogenic <i>E. coli</i></i>
Hbp	<i>Haemoglobin binding protein</i>
HUS	<i>Haemolytic uremic syndrome</i>
IBC	<i>Intracellular bacterial communities</i>
IgA	<i>Immunoglobulin A</i>
IPEC	<i>Intestinal pathogenic <i>E. coli</i></i>
LPS	<i>Lipopolysaccharide</i>
LT	<i>Thermo labile toxin</i>
MFP	<i>Membrane fusion protein</i>
MLEE	<i>Multilocus enzyme electrophoresis</i>
MNEC	<i>Meningitis/sepsis-associated <i>E. coli</i></i>
OM	<i>Outer membrane</i>
OMP	<i>Outer membrane protein</i>
ORF	<i>Open reading frame</i>
P	<i>Pyélonéphrite</i>
Pet	<i>Plasmid encoded toxin</i>

Pic	<i>Protein involved in intestinal colonization</i>
PssA	<i>Protease secreted by STEC</i>
Sat	<i>Secreted autotransporter toxin</i>
Sec	<i>General secretory pathway</i>
SepA	<i>Shigella extracellular protein</i>
SGB	<i>Streptococques de groupe B</i>
ShET	<i>Shigella enterotoxin</i>
SPATE	<i>Serine protease autotransporter of Enterobacteriaceae</i>
SRP	<i>Signal-recognition particle</i>
SSTD	<i>Système de sécrétion de type deux</i>
SSTQ	<i>Système de sécrétion de type quatre</i>
SSTT	<i>Système de sécrétion de type trois</i>
SSTU	<i>Système de sécrétion de type un</i>
ST	<i>Thermo stable toxin</i>
STEC	<i>Shiga-toxin producing E. coli</i>
Tae	<i>Tsh associated exotoxin</i>
Tat	<i>Twin-arginine translocation</i>
Tsh	<i>Temperature sensitive hemagglutinin</i>
TU	<i>Translocation unit</i>
UPEC	<i>Uropathogenic E. coli</i>
UTI	<i>Urinary tract infection</i>
Vat	<i>Vacuolating autotransporter toxin</i>

Introduction

Escherichia coli est une bactérie commensale de l'intestin ou un pathogène pouvant causer des maladies variées chez les humains et les animaux (Dozois et Curtiss, 1999). L'espèce *E. coli* peut être catégorisée en trois grands groupes : les souches pathogènes intestinales (IPEC, *intestinal pathogenic E. coli*), les souches pathogènes extra-intestinales (ExPEC, *extra-intestinal pathogenic E. coli*) et les souches commensales (Dobrindt, 2005 ; Russo et Johnson, 2003). Les *E. coli* pathogènes intestinales ont la capacité de causer des maladies entérique/diarrhéiques et sont un des plus importants pathogènes bactériens entériques (Nataro et Kaper, 1998 ; Taddei, Fasano *et al.*, 2005). Parmi les *E. coli* pathogènes extra-intestinales, les bactéries uropathogènes (UPEC) sont la cause la plus commune d'infection du tractus urinaire chez les humains et les bactéries associées à la méningite et à la septicémie (MNEC) sont la seconde cause de méningite néonatale en importance, après les streptocoques de groupe B (SGB) (Bonacorsi et Bingen, 2005 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Parham, Pollard *et al.*, 2005b). Les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires (APEC) sont associées à des infections extra-intestinales chez la volaille, comme l'aérosacculite, la péricardite, la cellulite et la septicémie. Ces maladies sont responsables de pertes économiques importantes dans l'industrie alimentaire (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Rodriguez-Siek, Giddings *et al.*, 2005b). De plus, ces souches seraient très semblables à celles causant des infections extra-intestinales chez les humains (Rodriguez-Siek, Giddings *et al.*, 2005a). Les souches d'*E. coli* commensales sont des membres communs de la flore normale intestinale des humains et des animaux (Russo et Johnson, 2003). Lors de ce projet, ces souches sont représentées par les isolats de la collection de référence ECOR (*E. coli reference collection*). La collection ECOR est un échantillon de 72 isolats naturels recueillis chez une variété d'hôtes de diverses régions géographiques assemblés par Ochman et Selander et représentent en partie la diversité génotypique de l'espèce *E. coli* (Ochman et Selander, 1984). Des analyses phylogénétiques ont classé *E. coli* en quatre groupes clonaux majeurs : A, B1, B2 et D (Herzer, Inouye *et al.*, 1990). Le premier groupe à émerger fut le groupe B2, suivi du groupe D et des deux groupes sœurs A et B1 (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998). Les souches du groupe B2 sont reconnues pour détenir un plus grand nombre de facteurs de virulence

que les souches du groupe D, alors que les souche des groupes A et B1 sont en général commensales (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998 ; Picard, Garcia *et al.*, 1999).

Les autotransporteurs sont une famille de protéines sécrétées par des bactéries Gram négatives ayant la capacité de diriger leur propre sécrétion à travers la membrane externe (aussi nommé le système de sécrétion de type V) (Dutta, Cappello *et al.*, 2002 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998 ; Kostakioti et Stathopoulos, 2004). Ces protéines possèdent toutes la même structure générale, mais ont différents rôles et fonctions dans la virulence (Dutta, Cappello *et al.*, 2002 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998). Les molécules d'autotransporteurs possèdent trois domaines : le domaine α , muni d'un peptide signal qui initie le transport à la membrane interne de la protéine précurseur ; le domaine passager, qui confère à la protéine sa fonction ; et le domaine β , qui accomplit la sécrétion à travers la membrane externe par la formation d'un pore (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998). Le domaine passager peut soit être relâché dans le milieu extracellulaire ou bien rester en contact avec la membrane externe de la bactérie (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Parmi les différentes familles d'autotransporteurs, les SPATEs (pour *Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae*) sont présents chez différents pathotypes d'*E. coli*. La contribution des SPATEs à la pathogenèse bactérienne n'est pas complètement élucidée. Cependant, ces protéines ne sont pas communes chez les bactéries non pathogènes (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

Lors de ce projet, une méthode de PCR en multiplexe a été développée afin de détecter la présence des gènes de différents autotransporteurs. La présence des séquences encodant 11 SPATEs (*tsh*, *vat*, *sat*, *pic*, *sigA*, *sepA*, *espP*, *espC*, *pet*, *eaaA* et *eatA*), 2 autotransporteurs de la famille AIDA (*agn43* et *aida-I*) ainsi que les cinq allèles connus de la séquence codant l'autotransporteur Ag43 (*agn43K12*, *agn43RS218*, *agn43EDL933*, *ang43aCFT073* et *agn43bCFT073*) a été déterminée. La prévalence de ces gènes a ensuite été évaluée chez des souches d'*E. coli* provenant de pathogénies aviaires (APEC), d'infections urinaires humaines (UPEC), de maladies intestinales (IPEC) et de souches commensales (la collection ECOR). Nous avons aussi étudié la localisation des gènes *tsh* et *vat* par une méthode d'hybridation de type Southern pour savoir si ces derniers se retrouvaient sur le chromosome bactérien ou bien sur un plasmide de virulence.

Les résultats démontrent que la présence des différents gènes d'autotransporteurs est distribuée de façon phylogénétique parmi les isolats analysés. Par exemple, les gènes *vat*, et *pic* sont associés aux souches provenant du groupe phylogénétique B2, alors que le gène *sat* est associé aux souches provenant du groupe phylogénétique D. On note aussi une distribution pathospécifique de ces gènes. La présence des gènes *vat*, *sat* et *pic* est associée aux souches d'*E. coli* provenant d'infections urinaires (UPEC), alors que le gène *tsh* est plus souvent retrouvé chez des souches causant des pathologies aviaires (APEC) et que les gènes *espP*, *sepA* et *espC* sont spécifiquement associés aux souches provoquant des maladies intestinales (IPEC).

Chapitre 1 : Revue de littérature

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli est une bactérie Gram négative qui colonise le tractus gastro-intestinal des humains, des mammifères et autres espèces animales (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004). La plupart des *E. coli* sont commensales, c'est-à-dire qu'elles ne provoquent pas de maladies chez l'hôte et vivent même en symbiose avec celui-ci (Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Nataro et Kaper, 1998). Cependant, certains groupes d'*E. coli* ont évolué de façon à provoquer une panoplie de maladies (Dozois et Curtiss, 1999). L'espèce *E. coli* peut être divisée en trois principales catégories : les souches commensales, les souches provoquant des maladies intestinales (IPEC) et les souches responsables de maladies extra-intestinales (ExPEC) (Dobrindt, 2005 ; Russo et Johnson, 2003). Il existe cependant différentes façons de classer cette espèce, par exemple : par sérotype, pathotype ou groupe phylogénétique.

1.2 Les sérotypes

Le sérotype regroupe différentes souches d'*E. coli* selon une combinaison spécifique des antigènes O (lipopolysaccharide, LPS), des antigènes H (flagelle) et des antigènes K (capsule) (Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Il existe à ce jour plus de 180 antigènes O (sérogroupe) connus et plus de 60 antigènes H connus, menant à plus de 10 000 combinaisons possibles (Robins-Browne et Hartland, 2002). Il existe cependant des souches d'*E. coli* qu'on ne peut classer de cette façon parce qu'il est impossible de déterminer avec certitude leurs différents antigènes O, H ou K (Robins-Browne et Hartland, 2002).

1.3 Les pathotypes

Un groupe de différentes souches bactériennes appartenant à la même espèce causant la même maladie en utilisant le même ensemble de facteurs de virulence est nommé pathotype (Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Parmi les pathotypes d'*E. coli* causant des maladies intestinales (IPEC), on retrouve les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entérophémorragiques (EHEC), les *E. coli*

entéroagrégatives (EAEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) et les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC). Les pathotypes d'*E. coli* causant des maladies extra-intestinales (ExPEC) comprennent les *E. coli* associées à la méningite néonatale et à la septicémie (MNEC), les *E. coli* uropathogènes (UPEC) et les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC). Tous ces pathotypes sont définis dans les prochaines sections.

1.3.1 Les souches pathogènes intestinales (IPEC)

Les souches d'*E. coli* provoquant des maladies entériques (IPEC, *intestinal pathogenic E. coli*) sont regroupées en six différents pathotypes : les *E. coli* entéropathogènes (EPEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entérotoxigènes (ETEC), les *E. coli* entéroagrégatives (EAEC), les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) et les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) (Nataro et Kaper, 1998).

1.3.1.1 *E. coli* entéropathogène (EPEC)

Les EPEC sont une des causes les plus communes de diarrhées infantiles (Clarke, Haigh *et al.*, 2003 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Selon un nouveau modèle de pathogenèse, les lésions occasionnées par les EPEC s'effectuent en quatre étapes (figure 1.1a). À la première étape, les cellules bactériennes expriment un pili de type IV (le Bfp, *bundle-forming pili*), l'intimine et le filament EspA. À la seconde étape, les bactéries adhèrent aux cellules épithéliales via le Bfp et le filament EspA, et le système de sécrétion de type III (SSTT) injecte le récepteur de l'intimine (Tir) et plusieurs molécules effectrices directement dans la cellule épithéliale. Les molécules effectrices provoquent des changements cytosquelettiques et le récepteur Tir est inséré dans la membrane de la cellule hôte. À la troisième étape, les filaments EspA sont évacués de la surface bactérienne et il y a liaison entre le récepteur Tir et l'intimine, résultant en un attachement intime et d'autres modifications du cytosquelette au site d'adhérence. Finalement à la quatrième étape, l'accumulation massive d'altérations du cytosquelette mène à la formation d'une structure en piédestal caractéristique des EPEC. Ceci provoque une détérioration de l'intégrité des jonctions serrées entre les cellules épithéliales et la perte d'électrolytes (Clarke, Haigh *et al.*, 2003).

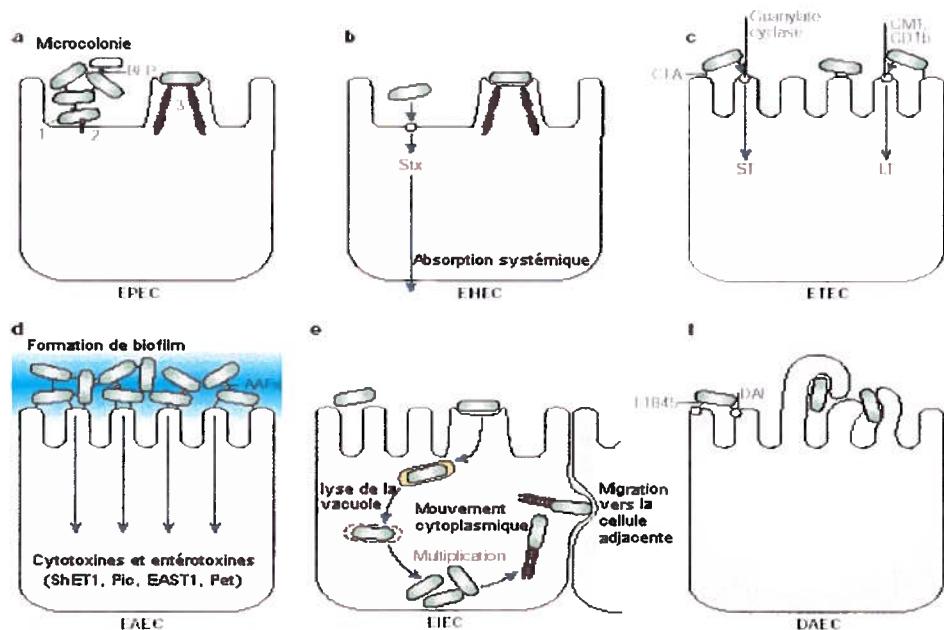


Figure 1.1 : Schéma de la pathogenèse intestinale de *E. coli* (Kaper, Nataro *et al.*, 2004).

1.3.1.2 *E. coli* entérohémorragique (EHEC)

Les EHEC causent des diarrhées sanguinolentes (colites hémorragiques), des diarrhées non sanguinolentes et le syndrome urémique hémolytique (HUS, *haemolytic uremic syndrome*) (figure 1.1b) (Caprioli, Morabito *et al.*, 2005 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Le réservoir naturel de ces pathogènes sont les bovins, et la maladie est associée à la consommation de bœuf haché qui n'a pas été suffisamment cuit (Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Les EHEC produisent Stx, une toxine découverte chez *Shigella dysenteriae*. Cette toxine produite dans le côlon passe dans la circulation sanguine et se rend jusqu'aux reins où elle cause des dommages aux cellules endothéliales via sa toxicité combinée à l'induction locale de cytokines et chimiokines (Kaper, Nataro *et al.*, 2004). En plus de la production de Stx, les EHEC suscitent des lésions similaires à celles causées par les EPEC (Nataro et Kaper, 1998).

1.3.1.3 *E. coli* entérotoxigène (ETEC)

Les *E. coli* entérotoxigènes causent des diarrhées aqueuses bénignes à sévères (Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Elles affectent surtout les enfants ainsi que les voyageurs (turista)

dans les pays en voie de développement (Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Ces organismes colonisent la surface du petit intestin et produisent des entérotoxines provoquant un déséquilibre de la muqueuse intestinale (figure 1.1c) (Nataro et Kaper, 1998). La colonisation s'effectue par l'intermédiaire des facteurs de colonisation (CF, *colonization factor*), il y a ensuite production de toxine thermolabile (LT) et/ou thermostable (ST) qui sont très semblables à la toxine exprimée par *Vibrio cholerae* (CT) (Kaper, Nataro *et al.*, 2004).

1.3.1.4 *E. coli* entéroagrégative (EAEC)

Les EAEC sont responsables de diarrhées aigues et persistantes dans les pays industrialisés ainsi que ceux en voie de développement (Huang, Okhuysen *et al.*, 2004 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Nataro, Steiner *et al.*, 1998). L'identification de ces souches se fait par des tests d'adhérences aux cellules HEp-2 (Huang, Okhuysen *et al.*, 2004). Un modèle de pathogenèse en trois étapes est proposé (figure 1.1d). À la première étape, il y a adhérence initiale de la bactérie à la muqueuse intestinale par l'intermédiaire d'un fimbriae nommé AAF (*aggregative adherence fimbriae*). À la seconde étape, il y a augmentation de la production de mucus, menant à la formation d'un épais mucus contenant des biofilms incrustés d'agrégats d'EAEC. Finalement, à la troisième étape, la bactérie sécrète certaines toxines (Pet, Pic, ShET1, ShET2, EAST1), provoquant une réponse inflammatoire accompagnée d'une production de cytokines et une sécrétion de liquide intestinal (Huang, Okhuysen *et al.*, 2004 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Nataro et Kaper, 1998 ; Nataro, Steiner *et al.*, 1998).

1.3.1.5 *E. coli* entéroinvasive (EIEC)

Les EIEC sont très semblables à *Shigella* spp. (Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Elles provoquent des diarrhées aqueuses et plus rarement la dysenterie (Nataro et Kaper, 1998). Le site d'infection de la bactérie est la muqueuse du côlon. La bactérie pénètre dans les cellules épithéliales grâce à des protéines sécrétées par un système de sécrétion de type III (les protéines IpaA-D). Il y a ensuite lyse de la vacuole endocytique (grâce à IpaB), multiplication bactérienne et migration vers les cellules adjacentes. Le mouvement des bactéries à l'intérieur du cytoplasme est rendu possible grâce la protéine de surface IcsA,

essentielle à la formation de filaments d'actine (figure 1.1e) (Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Nataro et Kaper, 1998).

1.3.1.6 *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC)

Les DAEC sont peu connues. L'apparition de diarrhée dues à cet agent pathogène semble être dépendante de l'âge du patient (> que 4 ans) (Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Nataro et Kaper, 1998). L'adhérence aux cellules épithéliales est attribuée à une adhésine de surface nommée F1845 et, plus rarement, à l'autotransporteur AIDA-I (figure 1.1f) (Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Nataro et Kaper, 1998).

1.3.2 Les souches pathogènes extra-intestinales (ExPEC)

Les pathotypes d'*E. coli* impliqués dans les infections extra-intestinales ont récemment été regroupés sous le vocable ExPEC (Russo et Johnson, 2000). Les ExPEC sont incapables de susciter des maladies entériques, mais peuvent coloniser le tractus intestinal de façon asymptomatique (Johnson et Russo, 2002 ; Russo et Johnson, 2003). Ainsi, elles provoquent des maladies seulement lorsqu'elles sortent du tractus gastro-intestinal et se logent au sein d'un site normalement stérile de l'hôte (Johnson et Russo, 2002). Parmi les souches ExPEC on compte notamment les souches d'*E. coli* associées à la méningite néonatale et la septicémie (MNEC) et les souches d'*E. coli* causant des infections urinaires (UPEC) (Russo et Johnson, 2000). En plus des maladies humaines, les ExPEC sont une cause significative de pertes économiques chez les animaux de ferme, particulièrement dans l'industrie avicole où les oiseaux sont souvent affectés par des souches d'*E. coli* pathogènes aviaires (APEC) (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Rodriguez-Siek, Giddings *et al.*, 2005b).

1.3.2.1 *E. coli* associées à la méningite néonatale et à la septicémie (MNEC)

Les MNEC sont la seconde cause de méningite néonatale après les streptocoques de groupe B (Bonacorsi et Bing, 2005). Afin de provoquer la méningite, les MNEC effectuent trois principales étapes pathophysiologiques. Tout d'abord, il y a translocation bactérienne du lumen intestinal vers la circulation sanguine. Ensuite, la bactérie survit et se multiplie causant une bactériémie. Finalement, la bactérie franchit la barrière

hématoencéphalique (BHE) et envahi le système nerveux central (figure 1.2) (Bonacorsi et Bingen, 2005 ; Kim, 2003 ; Xie, Kim *et al.*, 2004). Le mécanisme de la translocation intestinale est peu connu. La survie et la multiplication de la bactérie dans l'espace intravasculaire est attribuée à la présence d'une capsule de type K1, de protéines OmpA et de systèmes d'acquisition du fer (salmochelines) (Bonacorsi et Bingen, 2005 ; Kim, 2001 ; Kim, 2003). Plusieurs facteurs sont impliqués dans l'adhésion et l'invasion des cellules endothéliales du cerveau : pour l'adhésion, le fimbriae de type 1, la protéine OmpA, et à un moindre niveau le fimbriae de type S et l'autotransporteur Ag43 ont été identifiés ; pour l'invasion des cellules, les protéines Ibe et le CNF1 (*cytotoxic necrotizing factor 1*) semblent jouer un rôle déterminant (Xie, Kim *et al.*, 2004).

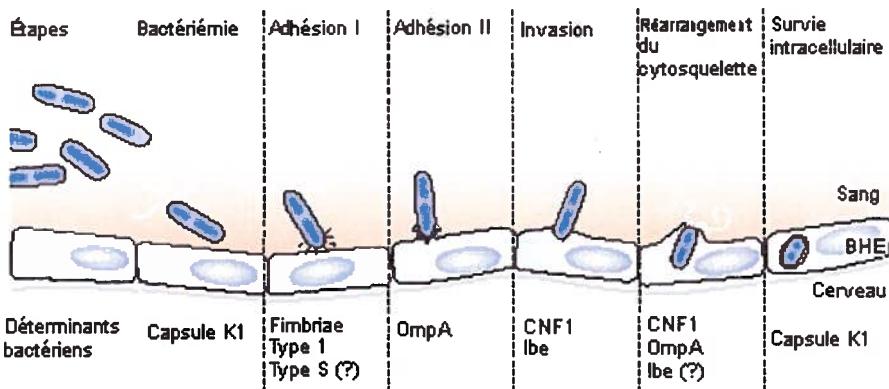


Figure 1.2 : Déterminants bactériens contribuant à la translocation *E. coli* à travers la barrière hématoencéphalique (BHE) (Kim, 2003).

1.3.2.2 *E. coli* uropathogène (UPEC)

Les UPEC sont la première cause d'infection urinaire humaine (Foxman, Barlow *et al.*, 2000 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004). Les UPEC peuvent provoquer trois types d'infection urinaire (UTI, *urinary tract infection*) : la bactériurie asymptomatique (ABU, *asymptomatic bacteriuria*), la cystite (C) lorsque l'infection est limitée à la vessie et la pyélonéphrite (P) lorsque l'infection se retrouve dans les reins (Marrs, Zhang *et al.*, 2005). Différentes adhésines comme le fimbriae de type 1 et autres (P, S et adhésine Dr), permettent aux UPEC de coloniser le tractus urinaire. Plusieurs toxines sont produites par ces bactéries, notamment l'hémolysine, le CNF1, et les autotransporteurs Sat, Pic et Vat. Les systèmes d'acquisition du fer (aérobactine, entérobactine, yersiniabactine,

salmocheline) ainsi que la capacité de croître dans l'urine sont essentiels à la survie des UPEC (Anderson, Dodson *et al.*, 2004 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Marrs, Zhang *et al.*, 2005). Il a récemment été découvert que les UPEC sont capables de former une structure ressemblant à un biofilm à l'intérieur des cellules épithéliales superficielles de la vessie chez la souris. Ces structures sont nommées « communautés bactériennes intracellulaires » (figure 1.3 ; IBC, *intracellular bacterial communities*). Peu après l'inoculation, les UPEC adhèrent et envahissent les cellules épithéliales de la vessie lors d'un procédé effectué par le fimbriae de type 1. La multiplication et la formation d'une structure désorganisée mènent à l'élaboration du IBC précoce. Il y a ensuite maturation en IBC intermédiaire, et finalement les UPEC peuvent se détacher du biofilm intracellulaire, devenir mobile, se diriger vers le lumen de la vessie et recommencer le cycle. Ce procédé pourrait faciliter la persistance bactérienne dans l'hôte ainsi que la transmission des bactéries dans l'environnement (Anderson, Dodson *et al.*, 2004).

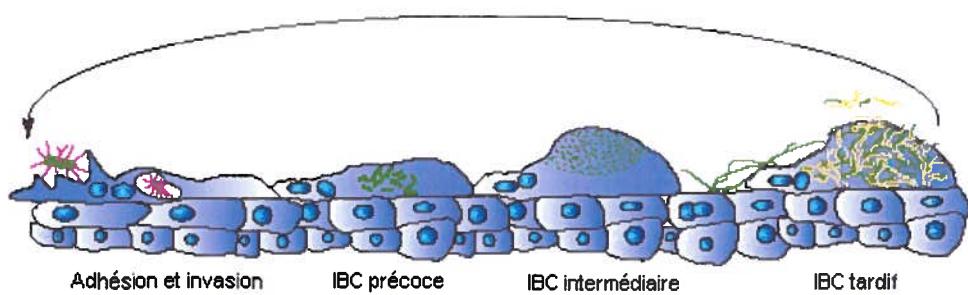


Figure 1.3 : Représentation schématique des communautés bactériennes intracellulaires (IBC, *intracellular bacterial communities*) dans les cellules épithéliales superficielles de la vessie murine. Les UPEC sont représentées en vert, les fimbriae de type 1 en rouge, et les flagelles en jaune (Anderson, Dodson *et al.*, 2004).

1.3.2.3 *E. coli* pathogène aviaire (APEC)

Les APEC sont associées aux infections extra-intestinales de la volaille, telles l'aérosacculite, la péricardite, la cellulite et la septicémie. Ces maladies sont responsables d'importantes pertes économiques dans l'industrie avicole (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Rodriguez-Siek, Giddings *et al.*, 2005b). Les souches d'*E. coli* pathogènes aviaires appartiennent principalement aux sérogroupes O1, O2 et O78 (Blanco, Blanco *et al.*, 1998 ; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Mellata, Dho-Moulin *et al.*, 2003). Les facteurs de

virulences associés aux APEC incluent les fimbriaes de type 1 et P et les curli pour l'adhésion. Les systèmes d'acquisition du fer (aérobactine, entérobactine, salmocheline), les lipopolisaccharides (LPS), les capsules (antigène K) et la production de protéines de surfaces seraient impliqués dans la résistance au sérum. Certaines APEC peuvent aussi produire des toxines (CLT, *chicken lethal toxin*) et les autotransporteurs Tsh et Vat (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Dozois, Daigle *et al.*, 2003 ; Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000 ; Mellata, Dho-Moulin *et al.*, 2003 ; Parreira et Gyles, 2003 ; Salvadori, Yano *et al.*, 2001). Il est présumé que les souches APEC sont similaires aux souches UPEC et qu'elles pourraient ainsi causer des infections extra-intestinales humaines véhiculées par l'ingestion de nourriture contaminée (Rodriguez-Siek, Giddings *et al.*, 2005a).

1.4 Les groupes phylogénétiques

La méthode du MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) permet d'étudier la variation polymorphe d'enzymes par électrophorèse. brièvement, cette technique analyse différents isolats selon la mobilité relative d'enzymes cellulaires hydrosolubles. Parce que la charge électrostatique nette de l'enzyme (et donc son taux de migration durant l'électrophorèse) est déterminée par sa séquence en acides aminés, la mobilité de ses variants (allozymes) est directement représentative des différents allèles génétiques (Selander, Caugant *et al.*, 1986). Cette méthode a permis d'élaborer une classification des souches d'*E. coli* faisant partie de la collection de référence « ECOR-Collection » (Ochman et Selander, 1984 ; Whittam, Ochman *et al.*, 1983). Cette collection de 72 souches provenant de diverses régions géographiques et de divers hôtes représente en partie la diversité génotypique de l'espèce *E. coli* (Ochman et Selander, 1984). Parmi ces 72 souches, 68 ont été classés en 4 principaux groupes phylogénétiques : A, B1, B2 et D (figure 1.4) (Herzer, Inouye *et al.*, 1990). Quatre souches commensales inclassables par la méthode du MLEE ont été regroupées dans le groupe E. Cependant, selon la méthode d'analyse par PCR des groupes phylogénétiques de Clermont (voir la section 2.7), ces souches sont reclassées parmi les quatre principaux groupes (ECOR-31, 37 et 42 dans le groupe phylogénétique D et ECOR-43 dans le groupe phylogénétique A) (Clermont, Bonacorsi *et al.*, 2000).

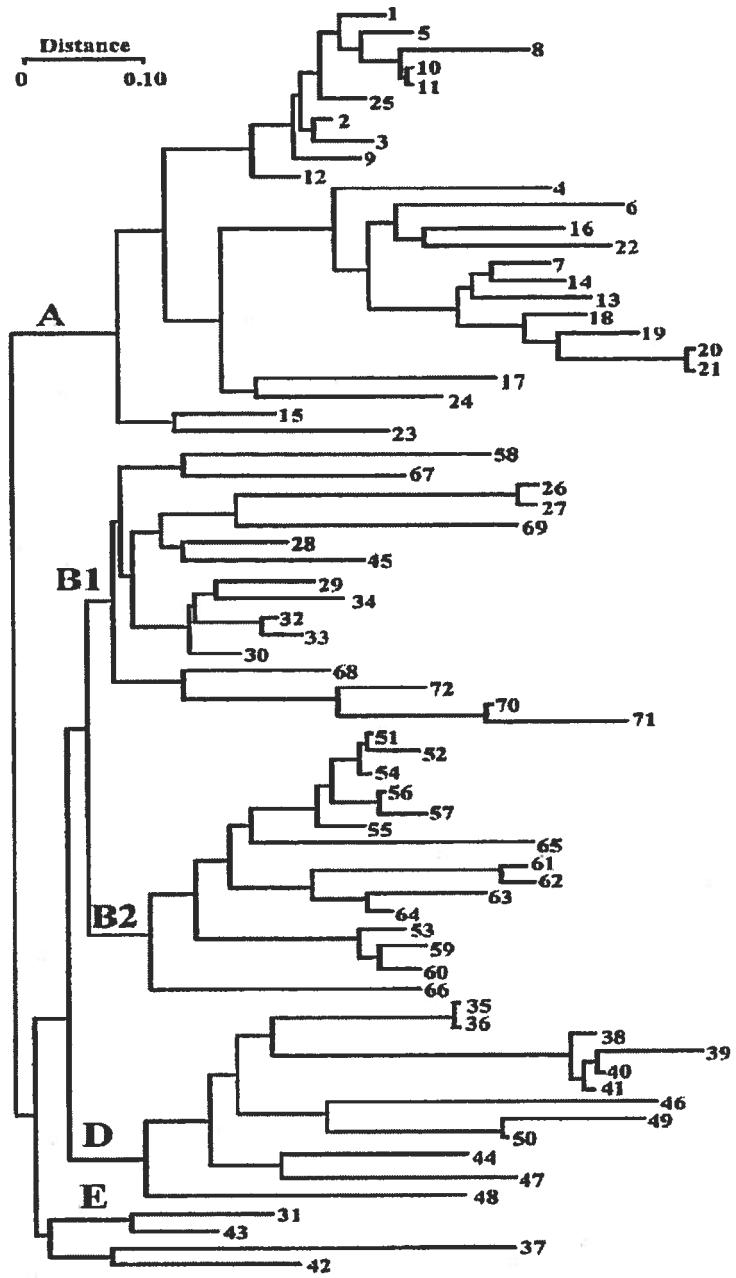


Figure 1.4 : Distribution phylogénétique des 72 souches d'*E. coli* de la ECOR-Collection (Herzer, Inouye *et al.*, 1990).

L'arbre phylogénétique ainsi créé a toujours été arbitrairement enraciné au groupe A, laissant supposer que ce groupe fut le premier à émerger dans l'histoire d'*E. coli* (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998). En utilisant *Salmonella enterica* comme groupe externe d'enracinement, Lecointre et ses collaborateurs ont redéfini la phylogénie d'*E. coli* (figure 1.5). Selon cette étude, le groupe B2 a été le premier à émerger, suivi du groupe D et enfin des groupes sœurs A et B1 (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998).

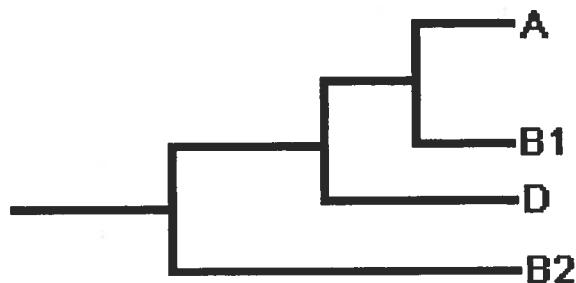


Figure 1.5 : Évolution des groupes phylogénétiques d'*E. coli* (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998).

Il semble exister un lien entre la virulence des souches d'*E. coli* causant des infections extra-intestinales et la phylogénie. En effet, les souches du groupe phylogénétique B2 sont hautement pathogènes et possèdent de nombreux facteurs impliqués lors des infections extra-intestinales chez des patients immunocompétents. Les souches du groupe D semblent posséder des facteurs de virulence en moins grand nombre que les souches du groupe B2, alors que les souches des groupes sœurs A et B1 ne détiennent que peu ou pas de facteurs de virulence impliqués lors des infections extra-intestinales (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998 ; Picard, Garcia *et al.*, 1999).

1.5 Les systèmes de sécrétion

Chez les bactéries Gram positives les protéines sécrétées ont besoin de traverser une seule membrane pour atteindre le milieu extracellulaire. Cependant, puisque les bactéries Gram négatives produisent deux membranes, la translocation des protéines à travers la membrane interne (cytoplasmique) mène au périplasme et la protéine doit donc aussi traverser la membrane externe pour se retrouver à la surface des cellules ou dans le milieu extracellulaire.

1.5.1 Systèmes de sécrétion à travers la membrane cytoplasmique

Il existe trois systèmes responsables de la sécrétion des protéines à travers la membrane cytoplasmique bactérienne : Sec (système de sécrétion général, *general secretory*) ; SRP (*signal-recognition particle*) et Tat (*twin-arginine translocation*). L'étude des phylogénies des voies Sec et SRP indique que ces systèmes sont les plus anciens. De plus, ces derniers ont été retrouvés chez tous les organismes dont le génome a été séquencé à ce jour (procaryote, archaeal et eucaryote) (Cao et Saier, 2003 ; Pallen, Chaudhuri *et al.*, 2003). Le système Tat, quant à lui, a tout d'abord été identifié pour l'import des protéines pH-dépendantes dans le lumen du thylakoïde. Contrairement aux systèmes Sec et SRP, les homologues du système Tat ne sont pas ubiquitaires chez les bactéries et ne sont pas retrouvés chez les levures et les animaux (Pallen, Chaudhuri *et al.*, 2003 ; Yen, Tseng *et al.*, 2002).

1.5.1.1 Le système Sec

Le système Sec est impliqué dans la translocation des protéines précurseurs à travers la membrane cytoplasmique et serait aussi requis pour l'insertion des protéines membranaires (Fekkes et Driessens, 1999). La translocation se fait via la chaperone cytosolique, SecB, et un complexe membranaire nommé le translocon. Le translocon consiste en une ATPase périphérique, SecA, et cinq protéines membranaires (SecY, SecE, SecG, SecD et SecF). Ce complexe forme un pore à travers la membrane interne par lequel les protéines peuvent passer (figure 1.6) (Driessens, Fekkes *et al.*, 1998). SecB se lie à la protéine précurseur par son extrémité C-terminale, ce qui empêche son repliement, et la mène au complexe SecA-SecYEG à la membrane interne. Il y a ensuite un

changement de conformation, stabilisé par SecD et SecF, et la protéine précurseur peut être acheminée vers le périplasme (Driesssen, Fekkes *et al.*, 1998 ; Fekkes et Driesssen, 1999).

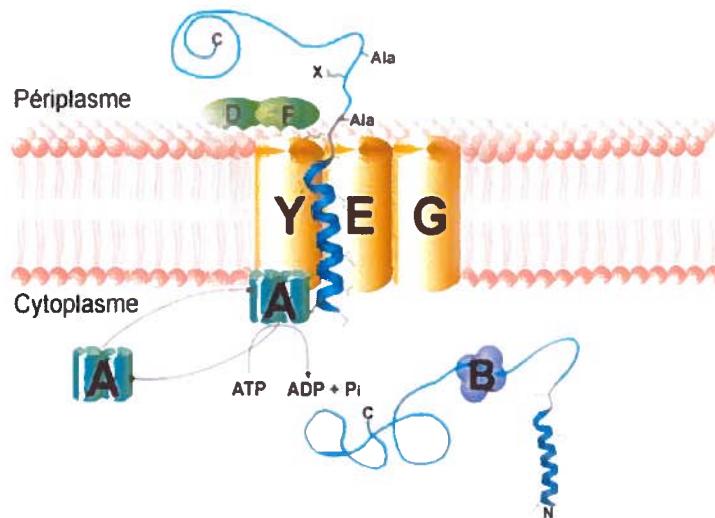


Figure 1.6 : Système de translocation Sec-dépendant chez *E. coli* (Paetzl, 2005).

1.5.1.2 Le système SRP

Le SRP est une particule ribo-protéique qui agit comme adaptateur entre la synthèse protéique et la machinerie de translocation à la membrane interne (Wild, Rosendal *et al.*, 2004). Le SRP bactérien consiste en un ARN 4.5S et la protéine Ffh interagissant avec le récepteur FtsY. La fonction du SRP est le transport co-traductionnel des protéines membranaires et sécrétées (figure 1.7) (Wild, Rosendal *et al.*, 2004). Tout d'abord, le SRP se lie au ribosome et au peptide signal naissant à son extrémité N-terminale (figure 1.7A). Il y a ensuite ralentissement de l'elongation de la chaîne polypeptidique (figure 1.7B). Le complexe SRP-chaîne-polypeptidique-ribosome est dirigé vers la membrane cytoplasmique et il y a liaison entre Ffh et le récepteur FtsY. Le peptide signal est relâché du SRP et inséré dans le pore de translocation (figure 1.7C). Finalement, Ffh et FtsY sont dissociés et le SRP est relâché (figure 1.7D) (Fekkes et Driesssen, 1999 ; Nagai, Oubridge *et al.*, 2003 ; Wild, Rosendal *et al.*, 2004).

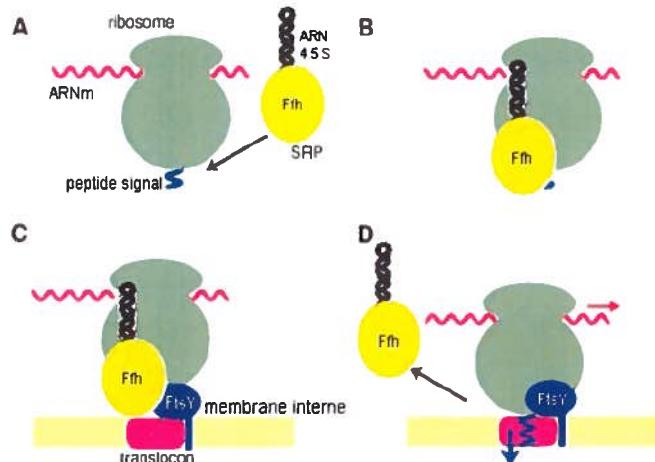


Figure 1.7 : Cycle fonctionnel du système SRP (Nagai, Oubridge *et al.*, 2003).

1.5.1.3 Le système Tat

Chez *E. coli* le système Tat consiste en quatre protéines, TatA, B, C et E. Les trois premières sont encodées sur le même opéron (*tatABC*), alors que TatE est codé ailleurs sur le chromosome bactérien (Yen, Tseng *et al.*, 2002). TatA et TatB sont des petites protéines ayant un seul domaine transmembranaire. TatC est une plus grosse protéine ayant au moins quatre domaines transmembranaires. TatE serait un paralogue de TatA très peu exprimé (Robinson et Bolhuis, 2004). Le système Tat est capable de transloquer des protéines repliées, particulièrement des protéines périplasmiques contenant des cofacteurs (comme FeS) ou bien des protéines se repliant trop rapidement ou trop étroitement pour être prises en charge par le système Sec (Robinson et Bolhuis, 2004). Le transport des protéines par ce système est énergisé par la force proton motrice, plutôt que par l'ATP, dans un processus dépendant du motif consensus double arginine présent sur le peptide signal des protéines transloquées (Yen, Tseng *et al.*, 2002). Il est généralement reconnu que l'export de protéines par le système Tat implique : (1) le repliement de la protéine nouvellement synthétisée suite à son émergence du ribosome, (2) l'acquisition d'un cofacteur, (3) le transit vers la membrane cytoplasmique et (4), la translocation de la protéine dans sa forme complètement (ou en majeur partie) repliée. Le scénario le plus probable de translocation implique la liaison du peptide signal de la protéine précurseur à

un complexe TatABC de 400-500 kDa approximativement avec une interaction spécifique aux sous unités TatB et TatC présentes en unités multiples (figure 1.8, étape 1). Cette liaison provoquerait le recrutement d'un complexe homooligomérique séparé de TatA d'environ la même taille afin de générer un super complexe fonctionnel (figure 1.8, étape 2). Ce super complexe catalyserait ensuite rapidement la translocation du substrat en utilisant l'énergie de la force proton motrice (figure 1.8, étape 3) (Robinson et Bolhuis, 2004).

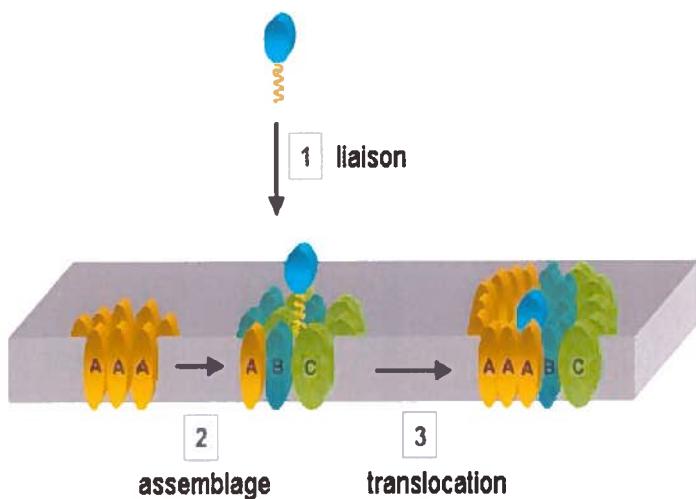


Figure 1.8 : Mécanisme envisageable pour le système Tat (Robinson et Bolhuis, 2004).

1.5.2 Systèmes de sécrétion à travers la membrane externe

Les protéines ayant pour but final le milieu extracellulaire doivent aussi traverser la membrane externe chez les bactéries Gram négative. Afin d'y parvenir, celles-ci ont développé plusieurs systèmes de sécrétion. Il y a à ce jour cinq catégories différentes de systèmes de sécrétion caractérisant le transport des protéines à travers la membrane externe connus et numérotées de I à V (figure 1.9). Cette classification est réservée aux bactéries Gram négatives (Desvaux, Parham *et al.*, 2004b ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

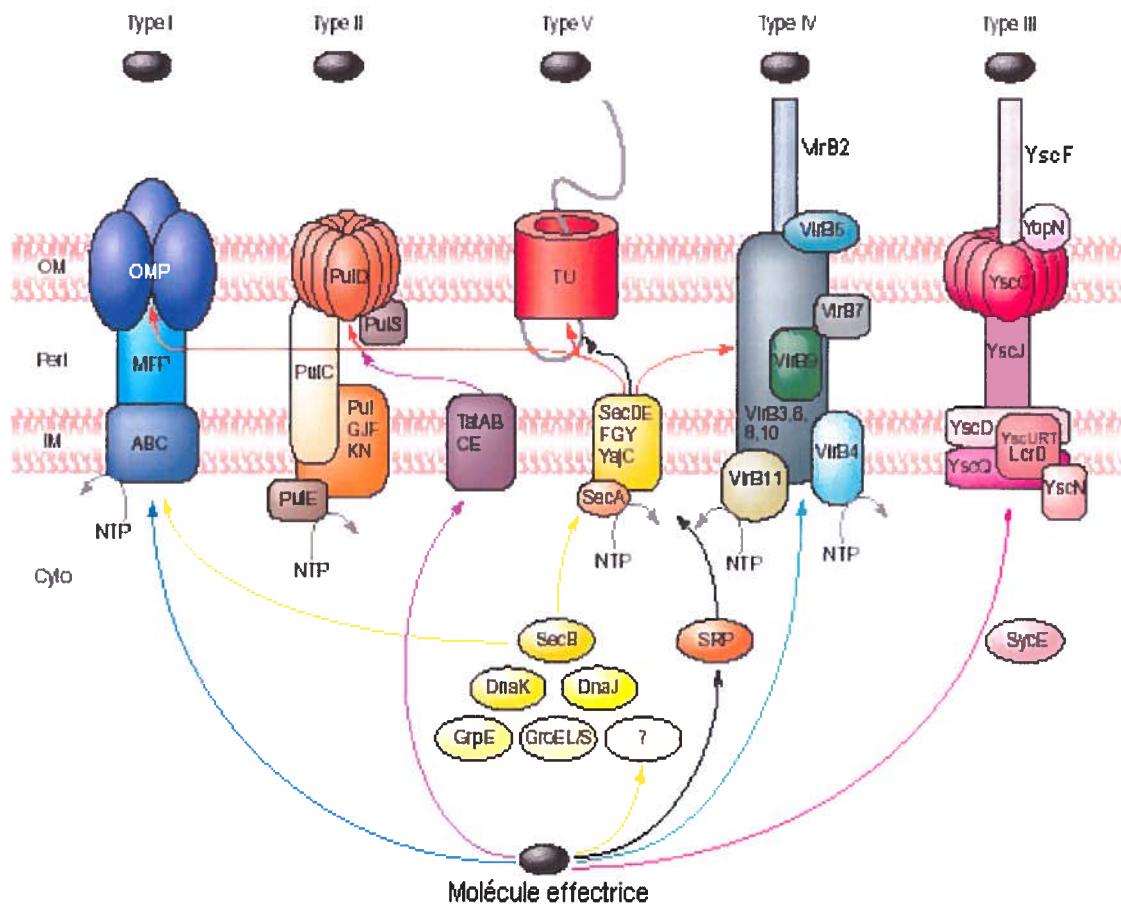


Figure 1.9 : Représentation schématique des différents systèmes de sécrétion chez les bactéries Gram négatives. Les flèches bleues représentent les molécules effectrices transloquées à travers les membranes interne et externe par le système de sécrétion de type I. Les flèches violettes représentent les molécules effectrices dirigées vers la voie Tat. Les flèches jaunes représentent les molécules effectrices dirigées vers un système de sécrétion via une molécules chaperonne, comme SecB. Les flèches rouges représentent les molécules effectrices transloquées à travers la membrane interne par le système Sec après avoir été dirigées par une molécule chaperone comme SecB. Les molécules ciblées vers la voie Sec via le SRP (*signal recognition particle*) sont représentées par des flèches noires, alors que les celles transloquées à travers les membranes internes et externes par le système de sécrétion de type IV sont représentées par les flèches vertes. Les flèches roses représentent les molécules effectrices transloquées à travers les membranes internes et externes par le système de sécrétion de type III. Abréviations : ABC, *ATP-binding cassette exporter* ; Cyto, cytoplasme ; IM, membrane interne (*inner membrane*) ; MFP, protéine de fusion membranaire (*membrane fusion protein*) ; OM, membrane externe (*outer membrane*) ; OMP, protéine formant un canal transmembranaire (*outer membrane channel-forming protein*) ; Peri, périplasme ; TU, unité de translocation (*translocation unit*) (Desvaux, Parham *et al.*, 2004b)

1.5.2.1 Le système de sécrétion de type I (SSTU)

Le système de sécrétion de type I est un système de transport ABC (*ATP-binding cassette*). Il est retrouvé chez presque tous les genres bactériens (Gram négatif) et est impliqué dans le transport d'un grand nombre de protéines et autres molécules ayant des fonctions diverses (toxines, protéases, lipases, polysaccharides capsulaires) (Binet, Letoffe *et al.*, 1997 ; Gentschev, Dietrich *et al.*, 2002 ; Hahn et von Specht, 2003). Le SSTU contient trois protéines : une protéine formant un pore à la membrane externe (OMP, *outer membrane protein*), une protéine de fusion membranaire (MFP, *membrane fusion protein*) et une protéine ABC (*ATP-binding cassette*) à la membrane interne (figure 1.9) (Binet, Letoffe *et al.*, 1997). Le processus le mieux caractérisé est l'export de l'hémolysine (HlyA) chez *Escherichia coli* (Hahn et von Specht, 2003). La synthèse, l'activation et la sécrétion de HlyA sont déterminées par l'opéron *hlyCABD* (Gentschev, Dietrich *et al.*, 2002). La machinerie d'export d'HlyA consiste en trois éléments : HlyB, HlyD et TolC. Le premier composé, HlyB, fait partie de la famille des ABC transporteurs. Cette protéine s'insère dans la membrane interne grâce à huit domaines transmembranaires et allie l'hydrolyse de l'ATP à l'export du substrat (Koronakis, Hughes *et al.*, 1995). HlyD fait partie de la famille des protéines de fusion membranaire (MFP). Cette protéine est ancrée à la membrane cytoplasmique par un seul domaine transmembranaire et possède un large domaine périplasmique permettant au substrat de ne pas subir de transformation dans le périplasme lors de sa translocation. Finalement, TolC forme un pore dans la membrane externe (protéine OMP). La protéine TolC n'est pas exclusive au transport de l'hémolysine et peut être recruté chez plusieurs systèmes d'exportation différents. Il semble que HlyB et HlyD forment un complexe stable à la membrane interne de la bactérie. La liaison du substrat (HlyA) au complexe HlyB-HlyD induirait un contact avec TolC via un trimère d'HlyD pour former un canal d'export trans-périplasmique. Ce complexe est transitoire et serait séparé dès le passage de l'hémolysine dans le milieu extracellulaire (Gentschev, Dietrich *et al.*, 2002).

1.5.2.2 Le système de sécrétion de type II (SSTD)

Le système de sécrétion de type II a été découvert chez *Klesbiella oxytoca* pour la sécrétion d'une lipoprotéine hydrolysant l'amidon : la pullanase (Sandkvist, 2001b). Ce

système est encodé par 12 à 16 gènes (selon les espèces bactériennes) et permet le transport de protéines ayant des fonctions variées (protéases, cellulases, pectinases, phospholipases, lipases, toxines) à travers la membrane externe bactérienne (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Sandkvist, 2001a ; Sandkvist, 2001b). Pour que ces protéines soient sécrétées par ce système (nommé le sécréton), elles doivent d'abord être transloquées à la membrane interne par le système Sec ou Tat (le translocon) et repliées dans le périplasme (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Russel, 1998 ; Sandkvist, 2001b). La protéine D appartient à la famille des sécrétines et est insérée dans la membrane externe formant un pore transmembranaire qui serait stabilisé par une lipoprotéine, la protéine S. La protéine E serait une kinase régulant le processus de sécrétion en fournissant l'énergie nécessaire pour la promotion de la translocation et l'assemblage des protéines G-K. Les protéines G-K possèdent une homologie avec le pili de type IV et auraient la possibilité de former un pseudopilus. La protéine C serait responsable de la reconnaissance du substrat. Il semblerait donc que les composants de ce système interagiraient afin de former un complexe multiprotéique enjambant les membranes interne et externe (figure 1.9) (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Russel, 1998 ; Sandkvist, 2001a ; Sandkvist, 2001b).

1.5.2.3 Le système de sécrétion de type III (SSTT)

Le système de sécrétion de type III est aussi nommé l'injectisome. Ce système a d'abord été découvert chez *Yersinia* puis a par la suite été identifié chez plusieurs bactéries pathogènes telles que *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bordetella pertussis*, *Chlamydia trachomatis* et *Escherichia coli* (Plano, Day *et al.*, 2001). La similarité des séquences nucléotidiques suggère que les gènes encodant les protéines structurales du système sont conservés parmi les différentes espèces bactériennes, alors que les protéines effectrices sécrétées par ce système sont très diversifiées (Galan et Collmer, 1999). Ce système est constitué d'une structure enjambant les membranes interne et externe de la bactérie et d'une structure se projetant vers l'extérieur (Roe, Hoey *et al.*, 2003). Cette structure ressemble à une aiguille hypodermique tel que démontré par des photos en microscopie électronique (figure 1.10) (Galan et Collmer, 1999).

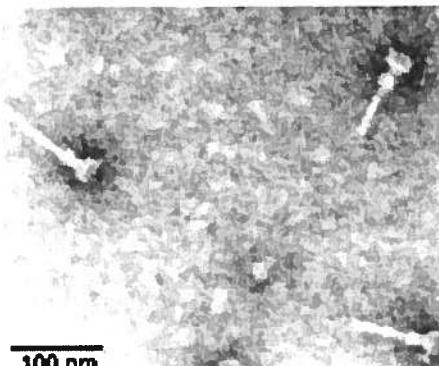


Figure 1.10 : Photo en microscopie électronique de complexes de seringues purifiés chez *Salmonella typhimurium*. Ce complexe est un tube long d'environ 120 nm ayant deux domaines clairement identifiables : une portion en forme d'aiguille se projetant à l'extérieur de la cellule bactérienne et une base cylindrique ancrant la structure aux membranes interne et externe (Galan et Collmer, 1999).

La sécrétion des protéines effectrices est déclenchée par le contact entre la bactérie et la cellule hôte eucaryote (Plano, Day *et al.*, 2001). Il existe une controverse concernant le mécanisme par lequel les molécules effectrices sont reconnues et ciblées par le SSTT. Une hypothèse suggère que le signal réside dans la partie 5' de l'ARNm, ce qui provoquerait le rapprochement du complexe ribosome-ARN au système de sécrétion permettant ainsi la sécrétion de la protéine en même temps que sa traduction. Une autre hypothèse suggère par contre que les 20 acides aminés de la partie N-terminale de la protéine servent de site de liaison à des chaperonnes cytoplasmiques qui cibleraient spécifiquement les molécules vers le système de sécrétion. De toutes façons, une fois la molécule effectrice arrivée au système de sécrétion de type III, sa sécrétion s'effectue sans la formation d'un intermédiaire périplasmique à travers une structure en forme de seringue composée d'environ vingt protéines différentes (figure 1.9) (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). YscJ serait une lipoprotéine formant un pont dans l'espace périplasmique entre les deux membranes de la bactérie. Les protéines YscURT posséderaient des domaines cytoplasmiques hydrophiles qui pourraient interagir avec des protéines périphériques associées au système de sécrétion telle que YscN, une ATPase cytoplasmique hautement conservée parmi les différents systèmes de sécrétion de type III. YscC fait partie de la famille des sécrétines et forme un canal transmembranaire à la membrane externe projetant YscF à l'extérieur de la bactérie formant ainsi la structure en

forme d'aiguille. La protéine YopN servirait de bouchon prévenant la sécrétion des protéines effectrices avant le contact avec la cellule hôte. Finalement, SycE est une petite protéine homodimérique qui agit comme chaperonne pour le ciblage à la membrane interne de certaines protéines effectrices (Cheng et Schneewind, 2000 ; Galan et Collmer, 1999 ; Plano, Day *et al.*, 2001 ; Roe, Hoey *et al.*, 2003)

1.5.2.4 Le système de sécrétion de type IV (SSTQ)

Le système de sécrétion de type IV le mieux connu est le système VirB/VirD4 d'*Agrobacterium tumefaciens* qui exporte une molécule d'ADN simple brin, l'ADN-T, à travers les membranes bactériennes dans les cellules des plantes où l'ADN-T s'intègre dans le génome de la plante (Burns, 1999). D'autres systèmes ont aussi été décrit chez *Bordetella pertussis* (toxine pertussique, Ptl), *Legionella pneumophila* (Dot/Icm), *Brucella suis*, *Bartonella henselae* et *Helicobacter pylori* (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Le système VirB/VirD4 est composé de onze protéines encodées par l'opéron *virB* (VirB1 à VirB11) et d'une protéine, VirD4, encodée par l'opéron *virD* (Yeo et Waksman, 2004). Les protéines Vir s'assemblent en une structure trans-enveloppe fonctionnant comme une machinerie formatrice de pili, et, en interagissant avec VirD4, deviennent un mécanisme de sécrétion pour la livraison intercellulaire d'ADN et de protéines (figure 1.9) (Schroder et Lanka, 2005). Les protéines du système de SSTQ peuvent être regroupées selon leurs fonctions et/ou leur localisation cellulaire en trois groupes : les protéines de la membrane cytoplasmique associées aux ATPases, les protéines formant le complexe central dans le périplasme et/ou les membranes, et les protéines formant le pilus et/ou localisées à la surface de la cellule (Christie et Vogel, 2000 ; Yeo et Waksman, 2004). Le premier groupe comprend les protéines VirB4, VirB11 et VirD4 (Christie et Vogel, 2000 ; Yeo et Waksman, 2004). VirB4 serait importante pour l'assemblage d'un canal transmembranaire robuste capable de transférer l'ADN de façon bidirectionnelle. VirB11 fait partie de la famille des protéines semblables à la NTPase PulE retrouvée dans le système de sécrétion de type II. VirB11 serait donc capable de fournir l'énergie pour le recrutement/assemblage/dissolution du système SSTQ. La protéine VirD4 serait impliquée dans la reconnaissance du substrat (l'ADN-T) et fonctionnerait comme la porte d'entrée du système de sécrétion (Schroder et Lanka,

2005). Le second groupe contient les protéines VirB6, VirB7, VirB8, VirB9 et VirB10 (Christie et Vogel, 2000 ; Yeo et Waksman, 2004). VirB6 aurait une fonction stabilisante pour la formation du canal de sécrétion. VirB7 est une lipoprotéine qui agirait comme connecteur entre le pilus extracellulaire et le complexe périplasmique central du système de sécrétion. VirB8 est localisé à la membrane interne avec la majorité de la protéine exposée dans l'espace périplasmique et serait l'ancrage à la membrane interne du complexe VirB8-VirB9-VirB10 formant un pont à travers le périplasme. VirB9 serait associé à VirB7 et formerait donc l'ancre à la membrane externe du pont transpériplasmique VirB8-VirB9-VirB10. Finalement, VirB10 serait un senseur répondant à l'état énergétique communiqué par VirB11 et VirD4, capable de former ou de dissocier le pont périplasmique entre les composants localisés aux membranes interne et externe (VirB4/VirD4 et VirB9, respectivement), ce qui serait l'équivalent d'ouvrir ou de fermer le canal de sécrétion pour le transfert du substrat (Schroder et Lanka, 2005). Le dernier groupe contient les protéines VirB1, VirB2 et VirB5 (Christie et Vogel, 2000 ; Yeo et Waksman, 2004). VirB1 fait partie de la super-famille des glycosylases et serait responsable de la perforation locale de la paroi de peptidoglycan chez les bactéries Gram négatives. VirB2 est la sous-unité structurale majeure du pilus. Enfin, VirB5 est une composante mineure du pilus dont la stabilité requiert la présence de VirB6. Cette protéine pourrait avoir une fonction d'adhésine favorisant l'attachement bactérien à la cellule hôte (Schroder et Lanka, 2005). Bref, après avoir contacté VirD4, le substrat (l'ADN-T) rencontre VirB11 d'où il entre dans le conduit transmembranaire rencontrant les composants du canal VirB6 et VirB8. Le contact ultime de l'ADN-T avant son transfert dans la cellule hôte se fait avec les composants VirB9 et VirB2 à la membrane externe de la bactérie (Schroder et Lanka, 2005).

1.6 Autotransporteurs (ou système de sécrétion de type V)

Le système de sécrétion de type V représente la plus grande famille de protéines sécrétées par un pore à la membrane externe chez les bactéries Gram négatives (Yen, Peabody *et al.*, 2002). Puisqu'aucune énergie ou facteur accessoire ne semble nécessaire à la translocation à travers la membrane externe, les protéines sécrétées par ce processus furent nommées autotransporteurs. Le système d'autotransporteur est divisé en trois sous-

groupes : le système d'autotransporteur conventionnel (ou type Va) ; la voie de sécrétion à deux partenaires (ou type Vb) ; et les autotransporteurs trimériques (ou type Vc) (figure 1.11) (Cotter, Surana *et al.*, 2005 ; Desvaux, Parham *et al.*, 2004a ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

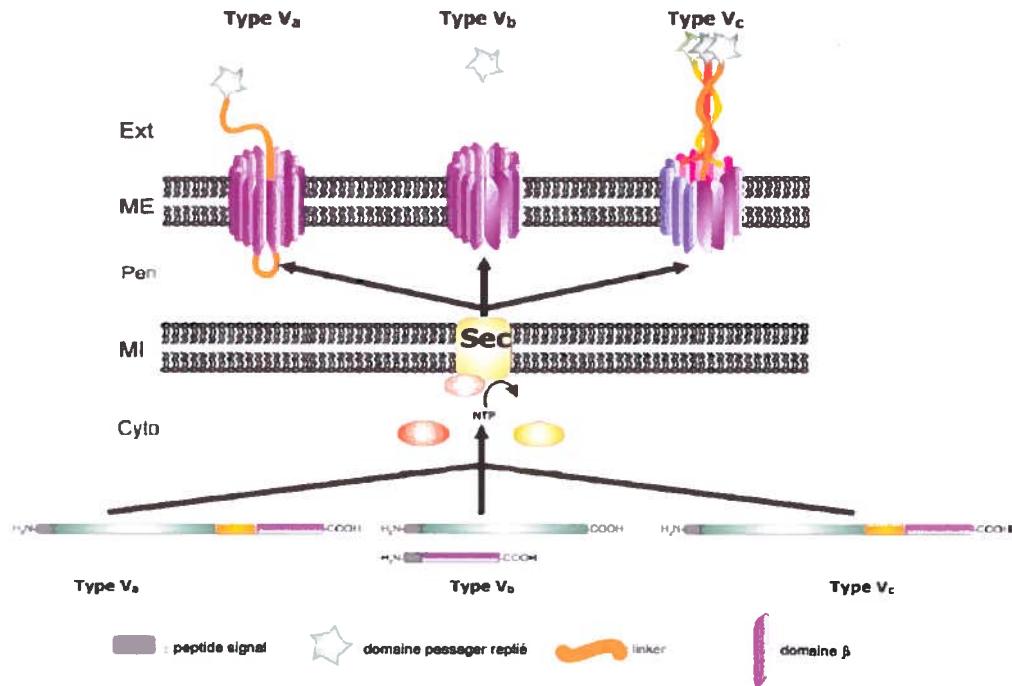


Figure 1.11 : Représentation schématique des systèmes de sécrétion de type V (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

1.6.1 Le système d'autotransporteurs conventionnel (type Va)

Ce processus a d'abord été décrit pour la protéase d'IgA1 produite par *Neisseria gonorrhoeae* (Pohlner, Halter *et al.*, 1987). Les protéines autotransporteurs possèdent trois domaines : une séquence signal, un domaine passager et une unité de translocation (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). La séquence signal est localisée à l'extrémité N-terminale de la protéine et permet le ciblage de la protéine vers la membrane interne pour sa translocation vers le périplasme. Le domaine passager (ou domaine α) confère la fonction effectrice à la protéine. Finalement, l'unité de translocation, située à l'extrémité C-terminale, contient une région « linker », ayant une structure secondaire d'hélice α , et

un domaine β qui adopte une structure tertiaire en forme de pore transmembranaire facilitant la translocation du domaine passager vers le milieu extracellulaire (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998). Les autotransporteurs sont synthétisés en tant que précurseurs dans le cytoplasme et relâchés dans le périplasme en tant que pro-protéines. La translocation à travers la membrane externe complète la sécrétion de l'autotransporteur (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a).

1.6.1.1 Translocation à la membrane interne

La séquence signal des protéines autotransporteurs contient les caractéristiques des peptides signaux Sec dépendant, où SecB est reconnue pour agir comme chaperonne moléculaire. Cette séquence signal possède (a) un domaine n constitué d'acides aminés chargés positivement, (b) un domaine h contenant des acides aminés hydrophobes, et (c) un domaine c ayant un site de reconnaissance consensus pour les peptidases. Cependant, certains autotransporteurs possèdent des séquences signal exceptionnellement longues contenant un domaine c semblable, mais deux domaines chargés positivement ($n1$ et $n2$) et deux domaines hydrophobes ($h1$ et $h2$). Ces séquences allongées serviraient peut-être à recruter des protéines accessoires autres que SecB, comme le SRP, ou diriger la sécrétion à travers la membrane interne via une voie alternative (par exemple : Tat) (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998). Il n'est donc pas exclus que la protéine précurseur soit transloquée vers le périplasme par d'autres moyens que le système Sec (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a).

1.6.1.2 Export à travers la membrane externe

Une fois transloquée à travers la membrane interne de la bactérie, la pro-protéine se retrouve dans le périplasme. Le statut de l'autotransporteur dans cet espace est controversé (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Il est suggéré que l'autotransporteur pro-protéine interagit avec l'environnement hydrophobe de la membrane externe promouvant son insertion spontanée et le repliement du domaine β en une structure de pore transmembranaire (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998). Pendant l'insertion du domaine β dans la membrane externe, le premier et le dernier feuillet β s'orienteraient de façon antiparallèle et formeraient des ponts hydrogènes afin

de refermer la conformation en anneau, permettant ainsi l'établissement d'un pore transmembranaire (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998). La structure exacte du pore est encore inconnue, néanmoins les analyses bioinformatiques prédisent que ce dernier serait constitué de 14 domaines transmembranaires antiparallèles de neuf à douze résidus chaque (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a). Le modèle proposé pour la translocation de l'autotransporteur à travers la membrane externe est un processus en deux étapes. La partie C-terminale de l'unité de translocation s'insère d'abord, suivi de la translocation du domaine passager déplié (ou en parti replié) à travers le canal hydrophile formé par le pore monomérique β (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a). Le repliement du domaine passager serait déclenché par une chaperonne intramoléculaire (autochaperonne) et débuterait vectoriellement dans une direction C-terminale à mesure que le domaine passager émergerait du pore à la surface bactérienne. En plus du pore β , qui permet la translocation du domaine passager, la région « linker » de l'unité de translocation serait essentielle à la sécrétion. Cette région serait impliquée dans la formation d'une structure en épingle à cheveux qui dirigerait la sécrétion du domaine passager à travers le canal formé par le domaine β (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a).

1.6.1.3 Maturation à la surface de la bactérie

Une fois à la surface bactérienne, il y a plusieurs alternatives possibles pour l'autotransporteur. Le domaine passager peut être clivé et complètement relâché dans le milieu extracellulaire. Pour certains autotransporteurs cependant, une fois le domaine passager clivé, ce dernier reste en contact avec la surface bactérienne via des interactions non covalentes avec le domaine β . Finalement, plutôt qu'être clivé, le domaine passager peut rester intact agissant alors comme une grande protéine ayant un domaine C-terminal relié à la membrane externe et un domaine N-terminal se prolongeant dans le milieu extracellulaire (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Le clivage du domaine passager peut se faire via une activité autocatalytique ou une protéase liée à la membrane bactérienne (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

À ce jour, le destin du domaine β inséré dans la membrane externe est inconnu. Cependant, puisque la structure du domaine β semble être assez stable et qu'une

accumulation de pores encastrés dans la membrane externe pourrait être létale pour la bactérie, il est tout à fait probable qu'un mécanisme de dégradation ou de régulation se produise (Desvaux, Parham *et al.*, 2004a).

1.6.2 La voie de sécrétion à deux partenaires (type Vb)

Chez le système de sécrétion de type Vb, comme pour le type Va, le domaine passager possède une séquence signal qui dirige sa translocation à travers la membrane interne de la bactérie. Après son export dans le périplasme, le domaine passager s'insère dans un pore transmembranaire formé par un domaine β . Une fois à la surface de la bactérie, le domaine passager peut subir d'autres transformations protéolytiques afin d'accomplir sa fonction (Jacob-Dubuisson, Locht *et al.*, 2001). Cependant, contrairement aux autotransporteurs conventionnels, la protéine n'est pas produite en un seul polypeptide. En effet, le domaine passager (aussi nommé l'exoprotéine) et le domaine β formant le pore transmembranaire (aussi nommé le domaine transporteur) sont traduits comme deux protéines séparées. Néanmoins, les gènes encodant ces deux protéines sont habituellement organisé en un seul opéron (Jacob-Dubuisson, Locht *et al.*, 2001). Trois modèles de ce système ont été étudiés : la sécrétion de l'adhésine FHA, la sécrétion et l'activation de ShlA chez *S. marcescens* et la sécrétion d'adhésines de haut poids moléculaire HMW1 et HMW2 chez *Haemophilus influenzae* (Jacob-Dubuisson, Locht *et al.*, 2001).

1.6.3 Les autotransporteurs trimériques (type Vc)

Les autotransporteurs trimériques sont représentés par l'adhésine YadA de *Yersinia enterocolitica* et l'adhésine Hia de *Haemophilus influenzae*. Ces protéines se distinguent des autotransporteurs conventionnels par la présence de courts domaines translocateurs s'organisant en trimères pour la formation du pore transmembranaire β (Cotter, Surana *et al.*, 2005). Les domaines passagers semblent aussi avoir une architecture trimérique. Chez tous les autotransporteurs trimériques, le domaine passager reste lié de façon covalente au domaine β une fois à la surface de la bactérie. Toutes ces protéines semblent avoir des fonctions d'adhésines impliquées dans l'interaction des bactéries avec la cellule hôte ou

des protéines de la matrice extracellulaire, ou bien agissant en tant que site de liaison pour des facteurs circulants de l'hôte (Cotter, Surana *et al.*, 2005).

1.6.4 Description de différents autotransporteurs

Les autotransporteurs sont présents seulement dans le domaine *Bacteria* et sont retrouvés dans le phylum des *Proteobacteria* (chez les classes α , β , γ et ϵ) (Yen, Peabody *et al.*, 2002). Le seul autre phylum chez qui les autotransporteurs ont aussi été retrouvés est le phylum *Chlamydiae* chez les genres *Chlamydia* et *Chlamydophila* (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). L'unité de translocation est très semblable parmi tous les autotransporteurs, alors que les domaines passagers (qui confèrent la fonction à la protéine) sont très diversifiés. Des analyses phylogénétiques ont classé les autotransporteurs en onze groupes (figure 1.12 et tableau 1.1) (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Yen, Peabody *et al.*, 2002).

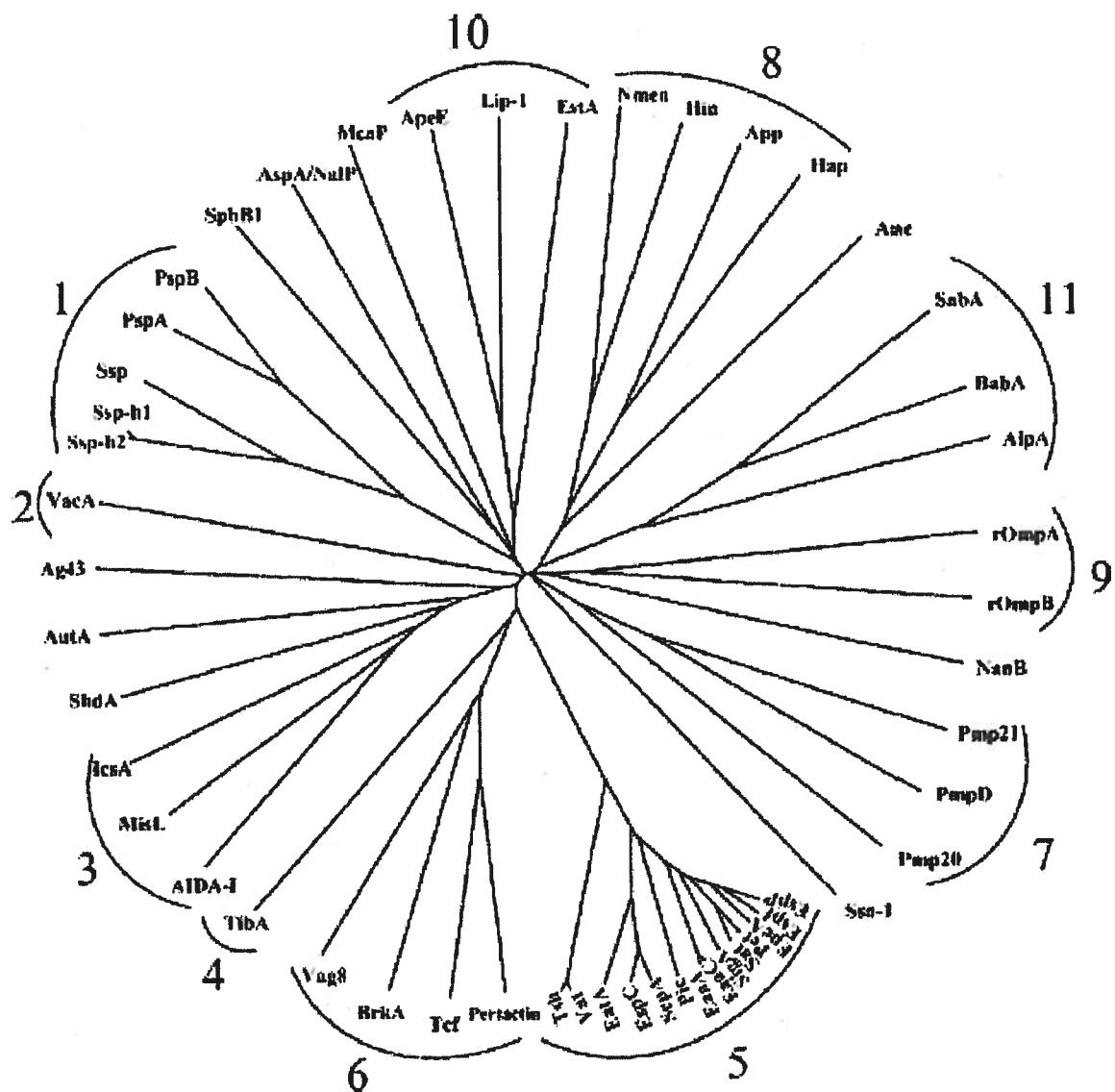


Figure 1.12 : Arbre phylogénétique des protéines autotransporteurs (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

Tableau 1.1 : Fonctions de divers autotransporteurs.

Protéine	Fonction	Espèce bactérienne
Groupe 1		
Ssp	Protéases	<i>S. marcescens</i>
Ssp-h1	Fonction inconnue	<i>S. marcescens</i>
Ssp-h2	Fonction inconnue	<i>S. marcescens</i>
PspA	Fonction inconnue	<i>P. fluorescens</i>
PspB	Fonction inconnue	<i>P. fluorescens</i>
Ssal	Fonction inconnue	<i>P. haemolytica</i>
SphB1	Traitements protéolytiques des protéines sécrétées	<i>B. pertussis</i>
AspA/NalP	Traitements protéolytiques des protéines sécrétées	<i>N. meningitidis</i>
Groupe 2		
VacA	Cytotoxine vacuolante	<i>H. pylori</i>
Groupe 3 et 4		
AIDA-I	Adhérence	<i>E. coli</i>
IcsA	Motilité intracellulaire	<i>S. flexneri</i>
MisL	Fonction inconnue	<i>S. enterica</i>
TibA	Adhérence/invasion	<i>E. coli</i>
Ag43	Formation de biofilms	<i>E. coli</i>
ShdA	Adhérence	<i>S. enterica</i>
AutA	Fonction inconnue	<i>N. meningitidis</i>
Groupe 5		
Tsh	Hémagglutinine	<i>E. coli</i>
SepA	Invasion (?)	<i>S. flexneri</i>
EspC	Entérotoxine	<i>E. coli</i>
EspP	Cytotoxine	<i>E. coli</i>
Pet	Entérotoxine	<i>E. coli</i>
Pic	Mucinase	<i>E. coli</i>
SigA	Activité cytopathique	<i>S. flexneri</i>
Sat	Cytotoxine vacuolante	<i>E. coli</i>
Vat	Cytotoxine vacuolante	<i>E. coli</i>
EpeA	Activité mucinolytique	<i>E. coli</i>
EatA	Fonction inconnue	<i>E. coli</i>
EspI	Dégénération des protéines du plasma	<i>E. coli</i>
EaaA	Fonction inconnue	<i>E. coli</i>
EaaC	Fonction inconnue	<i>E. coli</i>
Groupe 6		
Pertactin	Adhérence	<i>B. pertussis</i>
BrkA	Résistance au sérum	<i>B. pertussis</i>
Tef	Colonisation de la trachée	<i>B. pertussis</i>
Vag8	Fonction inconnue	<i>B. pertussis</i>
Groupe 7		
PmpD	Adhérence	<i>C. trachomatis</i>
Pmp20	Adhérence	<i>C. pneumoniae</i>
Pmp21	Adhérence	<i>C. pneumoniae</i>

Tableau 1.1 - suite

Protéine	Fonction	Espèce bactérienne
Groupe 8		
Protéase IgA1	Dégradation d'IgA1	<i>N. meningitidis, H. influenzae</i>
App	Adhérence	<i>N. meningitidis</i>
Hap	Adhérence, formation de microcolonies	<i>H. influenzae</i>
Groupe 9		
rOmpA	Adhérence	<i>R. rickettsii</i>
rOmpB	Adhérence	<i>R. rickettsii</i>
Groupe 10		
ApeE	Hydrolyse des esters naphthyl	<i>S. enterica</i>
EstA	Activité lipolytique	<i>P. aeruginosa</i>
Lip-1	Hydrolyse des acétates naphthyl	<i>X. luminescens</i>
McaP	Adhérence	<i>M. catarrhalis</i>
Groupe 11		
BabA	Adhérence	<i>H. pylori</i>
SabA	Adhérence	<i>H. pylori</i>
AlpA	Adhérence	<i>H. pylori</i>
Non groupées		
Aae	Adhérence	<i>A. actinomycetemcomitans</i>
NanB	Activité sialidase	<i>P. haemolytica</i>

Les domaines passagers semblent s'être diffusés parmi les différentes espèces bactériennes par transfert horizontal, alors que ce n'est pas le cas pour le domaine β . En effet, tandis que le domaine β des protéases d'IgA1 et des autotransporteurs protéases de séries des *Enterobacteriaceae* (SPATEs, *Serine Protease Autotransporter of Enterobacteriaceae*) ont des lignages évolutifs différents (groupe 8 et 5), leurs domaines passagers sont reliés et font parti du clan des protéases de séries (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). À ce jour, tous les domaines passagers caractérisés semblent avoir des implications dans la virulence (Tableau 1.1).

Le groupe 1 contient les autotransporteurs de la famille des subtilases. Ces autotransporteurs partagent un site catalytique ressemblant à celui de la famille des trypsin, mais ayant évolué de façon convergente. Puisque ces protéines sont mieux caractérisées chez *Bacillus subtilis*, elles ont hérité du nom subtilase. Les autotransporteurs faisant parti des groupes 2 et 11 sont des facteurs de virulence retrouvés chez *Helicobacter pylori*. Cette bactérie colonise la muqueuse gastrique humaine et est un important facteur de risque pour le développement d'ulcères, d'adénocarcinomes et de lymphomes gastriques. La famille AIDA (voir la section 1.6.4.1) comprend les autotransporteurs des groupes 3 et 4 et est caractérisée par un domaine conservé de 644 résidus enjambant le domaine passager et le domaine β . Les autotransporteurs protéases de séries se retrouvent parmi les groupes 5 et 8. Les SPATEs font parti du groupe 5 (voir la section 1.6.4.2) et le groupe 8 contient notamment les protéases d'IgA1, qui ont été les premiers autotransporteurs à être caractérisés. Le groupe 6 contient les autotransporteurs de *Bordetella* qui sont des protéines importantes pour la virulence des espèces faisant parties de ce genre. Le groupe 7 est constitué des autotransporteurs retrouvés chez les *Chlamydiae*, le seul autre phylum, hormis les *Proteobacteriaceae*, à posséder ce genre de protéines. Le groupe 9 regroupe les autotransporteurs retrouvés chez les *Rickettsiae* (α -*Proteobacteria*), des organismes intracellulaires infectant les arthropodes, les vertébrés et causant le typhus chez les humains. Finalement, le groupe 10 regroupe des autotransporteurs ayant des activités de lipases et d'estérases. Il existe aussi des autotransporteurs non classés ayant des activités d'adhésion et sialidases (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

1.6.4.1 Les autotransporteurs de la famille AIDA

La famille des autotransporteurs AIDA est composée de plus de 55 protéines. Certains des autotransporteurs les mieux caractérisés en font parti, notamment l'adhésine à adhérence diffuse AIDA-I (qui a donné son nom à cette famille) et la protéine à phase variable Ag43 (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

1.6.4.1.1 AIDA-I

AIDA (*adhESin involved in diffuse adherence*) a d'abord été identifiée chez la souche EPEC 2787 (O126:H27) isolée d'un patient souffrant d'une diarrhée infantile (Benz et Schmidt, 1989 ; Laarmann et Schmidt, 2003). Chez cette souche, deux gènes sont nécessaires pour un phénotype d'adhérence diffuse complet aux cellules épithéliales : *aah* et *aidA*. *aidA* encode une protéine précurseur de 132 kDa, qui après les étapes de transformation et sécrétion propres aux autotransporteurs se définit comme un domaine fonctionnel de 79,5 kDa et d'un domaine β (constituant l'unité de translocation) de 47,5 kDa. Le domaine fonctionnel de l'adhésine AIDA-I demeure relié à la membrane externe de la bactérie par des liens non covalents après son clivage, cependant l'adhésine peut être relâchée dans le milieu extracellulaire lorsque chauffée à 60°C. Pour être complètement fonctionnelle, l'adhésine nécessite des modifications post-traductionnelles effectuées par le produit du gène *aah* (*autotransporter adhesin heptosyl-transferase*). Le récepteur d'AIDA-I est la glycoprotéine gp119 à la surface des cellules épithéliales des mammifères (Benz et Schmidt, 1989 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Laarmann et Schmidt, 2003 ; Maurer, Jose *et al.*, 1999). En plus de ses fonctions d'adhésine, AIDA-I est aussi capable d'entraîner une agrégation bactérienne via une auto reconnaissance ou via une interaction AIDA-Ag43 intercellulaire et est une initiatrice efficace lors de la formation de biofilms (Sherlock, Schembri *et al.*, 2004).

1.6.4.1.2 Ag43

Ag43 est le produit du gène *flu* (aussi nommé *agn43*) chez *E. coli* (Diderichsen, 1980 ; Hasman, Chakraborty *et al.*, 1999 ; Henderson et Owen, 1999). Suite à sa sécrétion par le domaine β , le domaine passager d'Ag43 est clivé et reste relié à la membrane externe de la bactérie (Roche, McFadden *et al.*, 2001). Cette adhésine confère aux bactéries la

capacité de s'autoagrérer via des interactions Ag43-Ag43. Ces interactions contribuent à la formation de biofilms afin de coloniser les surfaces et permettre la persistance à long terme des bactéries uropathogènes à l'intérieur de la vessie (Anderson, Palermo *et al.*, 2003 ; Hasman, Chakraborty *et al.*, 1999 ; Owen, Meehan *et al.*, 1996). De plus, une étude récente suggère que la glycosylation de l'autotransporteur Ag43 modifie ses caractéristiques d'adhésion afin de cibler les cellules épithéliales humaines, sans toutefois altérer de possibles interactions Ag43-Ag43 (Sherlock, Dobrindt *et al.*, 2006). Ag43 est un composé cellulaire majeur et son nombre de copies peut s'élever jusqu'à 50 000 par cellule. Selon une étude d'Owen et ses collaborateurs, 77 % et 60 % des souches d'*E. coli* entéropathogènes et uropathogènes (respectivement) seraient capables d'exprimer Ag43 (Owen, Meehan *et al.*, 1996). L'expression d'Ag43 se fait selon une variation de phase régulée par l'action de la Dam-méthylase (régulation positive) et du senseur OxyR (régulation négative). OxyR agirait comme un répresseur en se liant à une région en aval du site de départ de transcription d'*agn43* (entourant trois sites 5'-GATC-3') prévenant ainsi la transcription du gène, résultant en un phénotype Ag43⁻. La méthylation de cette région (par la Dam-méthylase) entraverait la liaison du répresseur OxyR et donc, permettrait la transcription du gène *agn43* conférant un phénotype Ag43⁺ (Hasman, Chakraborty *et al.*, 1999 ; Henderson et Owen, 1999 ; Schembri, Hjerrild *et al.*, 2003 ; Waldron, Owen *et al.*, 2002). À ce jour, il existe cinq variants connus du gène encodant l'autotransporteur Ag43 : la séquence provenant de la souche *E. coli* MG1655 (*agn43K12*), la séquence provenant de la souche causant des méningites néonatales *E. coli* RS218, (*agn43RS218*), la souche entérohémorragique *E. coli* EDL933 possède deux copies identiques d'*agn43* (*agn43EDL933*) et finalement, la souche uropathogène *E. coli* CFT073 possède deux copies non identiques du gène *agn43* (*agn43aCFT073* et *agn43bCFT073*) (Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004).

1.6.4.2 Les SPATEs

Les SPATEs sont retrouvés chez *E. coli* et *Shigella* spp. Comme les protéases d'IgA1, ces protéines possèdent un motif consensus de protéase de sérine. La contribution des SPATEs à la pathogenèse n'est pas complètement élucidée. Ces protéines ont plusieurs caractéristiques en commun : (a) au contraire des protéases d'IgA1, aucun SPATE ne

semble apte à cliver les IgA1, (b) le motif protéase de sérine des SPATEs ne semble pas jouer un rôle dans les différentes étapes de transformation et de sécrétion, (c) chaque SPATE est une des protéines sécrétées les plus prédominante chez leurs pathogènes respectifs, (d) la presque totalité des SPATEs a été identifiée chez des organismes pathogènes et (e) les SPATEs sont des protéines hautement immunogènes (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004).

1.6.4.2.1 Tsh (Hbp)

Tsh (*temperature-sensitive hemagglutinin*) fut le premier SPATE à être identifié en 1994 chez la souche *E. coli* pathogène aviaire χ 7122. Cet autotransporteur a une fonction d'hémagglutinine thermosensible pour les érythrocytes de volaille (Provence et Curtiss, 1994). Le domaine passager de 106 kDa est exporté à travers un domaine β de 33 kDa. Le domaine passager reste temporairement lié à la membrane externe, avant d'être relâché dans le milieu extracellulaire (Stathopoulos, Provence *et al.*, 1999). La présence de Tsh est associée à la virulence des souches APEC. En effet, Tsh semble augmenter le taux de colonisation et le développement d'aérosacculites chez les poulets. Tsh est encodé sur un plasmide de virulence transmissible de type Col-V, pAPEC-1, retrouvé chez la souche pathogène aviaire χ 7122 (Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000).

Tsh est presqu'identique à l'autotransporteur Hbp (*Hemoglobin-binding protease*) identifié chez la souche *E. coli* EB1 isolée d'un cas d'infection intra-abdominale humain (Otto, van Dooren *et al.*, 1998). Hbp interagit spécifiquement avec l'hémoglobine humaine, la dégrade et se lie à l'hème ainsi relâché pour le rendre disponible à la croissance bactérienne non seulement pour *E. coli*, mais aussi pour d'autres bactéries présentes dans la lésion lors d'infection mixtes (Otto, van Dooren *et al.*, 2002 ; Otto, van Dooren *et al.*, 1998). Il semblerait donc que Tsh/Hbp contribuerait à au moins deux maladies infectieuses différentes : les infections intra-abdominales humaines et les infections du tractus respiratoire chez la volaille.

1.6.4.2.2 Vat

Vat (*vacuolating autotransporter toxin*) est une cytotoxine vacuolante nécessaire à la virulence de la souche APEC Ec222. La structure de la protéine consiste en une séquence

signal de 5,7 kDa, d'un domaine passager (la toxine) de 111,8 kDa et d'un domaine β de 30,5 kDa (Parreira et Gyles, 2003 ; Salvadori, Yano *et al.*, 2001). Un homologue de Vat a aussi été identifié chez la souche uropathogène *E. coli* CFT073, bien que cette protéine fût d'abord identifiée comme l'autotransporteur Tsh, créant ainsi une confusion. En plus de leur phénotype différent, il a aussi été révélé que c'est deux protéines (Vat et Tsh) ne partageaient que 78 % d'identité et que la séquence nucléotidique de cet homologue trouvé chez *E. coli* CFT073 partageait 98 % d'homologie avec la séquence encodant l'autotransporteur Vat chez la souche *E. coli* Ec222 (Heimer, Rasko *et al.*, 2004 ; Parreira et Gyles, 2003). De plus, la séquence encodant Tsh est localisée sur un plasmide de virulence alors que la séquence encodant Vat se retrouve sur un îlot de pathogénicité adjacent au gène ARNt *thrW* chez les souches *E. coli* Ec222 et CFT073 (Parham, Pollard *et al.*, 2005b ; Parreira et Gyles, 2003).

1.6.4.2.3 Sat

Sat (*secreted autotransporter toxin*) est une protéine de 107 kDa sécrétée par la souche uropathogène *E. coli* CFT073. Cet autotransporteur est une toxine vacuolante qui élicite des dommages aux cellules rénales lors d'infections expérimentales du tractus urinaire (Guyer, Henderson *et al.*, 2000 ; Guyer, Radulovic *et al.*, 2002). Récemment, Sat a aussi été identifié chez des souches d'*E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) causant des diarrhées et a démontré une activité entérotoxique se manifestant par une perte de l'absorption normale chez des cellules intestinales observée *in vitro* et *in vivo* (Taddei, Fasano *et al.*, 2005 ; Taddei, Moreno *et al.*, 2003).

1.6.4.2.4 Pic

L'autotransporteur Pic (*protein involved in intestinal colonization*) a d'abord été identifié chez les souches *E. coli* entéroagrégatives O42 et *S. flexneri* 2457T et est identique à la protéine nommée Shmu (*Shigella mucinase*) encodée sur l'îlot de pathogénicité *she* de *Shigella*. Un homologue de cet autotransporteur, PicU, a ensuite été découvert chez une souche d'*E. coli* uropathogène (Henderson, Czeculin *et al.*, 1999 ; Parham, Srinivasan *et al.*, 2004 ; Rajakumar, Sasakawa *et al.*, 1997). Pic est une protéine multifonctionnelle ayant des activités de mucinase, de résistance au sérum,

d'hémagglutination et pouvant induire une réponse immunitaire efficace chez des enfants souffrant de diarrhées causées par des EAEC (Bellini, Elias *et al.*, 2005 ; Henderson, Czeczulin *et al.*, 1999 ; Parham, Srinivasan *et al.*, 2004). À l'intérieur du gène *pic*, sur le brin antisens se retrouvent deux autres gènes *set1B* et *set1A*. Ces deux gènes codent pour les sous unités de 7 kDa et 20 kDa formant la toxine ShET1 (*Shigella enterotoxin 1*) de 55 kDa (formée de 5 sous unités B et d'une sous unité A) (Fasano, Noriega *et al.*, 1995). Ce type d'encodage (sens et antisens) est rare chez les bactéries. Cependant, puisque tous les gènes codant pour les SPATEs sont semblables, il ne serait pas étonnant de retrouver ce même phénomène chez d'autres gènes d'autotransporteurs faisant parti de cette famille.

1.6.4.2.5 SigA

L'îlot de pathogénicité *she* de *Shigella* code aussi pour un autre autotransporteur : SigA. SigA a des effets cytopathiques sur des cellules HEp-2 et est en parti responsable de la capacité de *Shigella flexneri* à induire une accumulation de fluides dans des boucles iléales de lapin, ce qui suggère un rôle dans la pathogenèse infectieuse de *Shigella* (Al-Hasani, Henderson *et al.*, 2000 ; Rajakumar, Sasakawa *et al.*, 1997).

1.6.4.2.6 SepA

SepA (*Shigella extracellular protein*) est la principale protéine sécrétée de *Shigella flexneri* et est encodée sur un plasmide de virulence (Benjelloun-Touimi, Sansonetti *et al.*, 1995). La contribution de SepA pour la virulence de *Shigella* n'est pas entièrement élucidée. Cependant, des mutants dépourvus du gène *sepA* ont démontré une capacité réduite dans l'induction d'une atrophie mucosale et de l'inflammation du tissu intestinal dans un modèle expérimental utilisant des boucles iléales de lapin. Ces résultats suggèrent que SepA pourrait détenir un rôle lors de l'invasion des tissus par *Shigella* (Benjelloun-Touimi, Sansonetti *et al.*, 1995 ; Benjelloun-Touimi, Si Tahar *et al.*, 1998).

1.6.4.2.7 EspP (PssA)

EspP (*extracellular serine protease plasmid-encoded*) a été identifiée chez la souche entérohémorragique *E. coli* O157:H7 presque simultanément à PssA (*protease secreted by STEC*) chez la souche produisant la Shiga-toxine *E. coli* O26:H- (Brunder, Schmidt *et al.*, 1997 ; Djafari, Ebel *et al.*, 1997). Ces deux protéines sont identiques et sont encodées sur un grand plasmide de virulence. EspP est une protéase capable de cliver la pepsine A et le facteur V de coagulation humain, ce qui suggère que cette protéine pourrait contribuer à l'hémorragie mucosale observée chez les patients atteint de colites hémorragiques (Djafari, Ebel *et al.*, 1997).

1.6.4.2.8 EspC

EspC (*EPEC-secreted protein C*) est une protéine sécrétée par la souche entéropathogène *E. coli* E2368/69 (Mellies, Navarro-Garcia *et al.*, 2001 ; Stein, Kenny *et al.*, 1996). EspC est hautement immunogène et sa sécrétion semble être co-régulée avec l'expression des protéines sécrétées par la machinerie du système de sécrétion de type III (Jarvis, Giron *et al.*, 1995 ; Kenny et Finlay, 1995). La fonction d'EspC est encore inconnue. Il a cependant été démontré par des expériences en chambre de Ussing qu'EspC est une entérotoxine (Mellies, Navarro-Garcia *et al.*, 2001).

1.6.4.2.9 Pet

Pet (*plasmid-encoded toxin*) a tout d'abord été identifié chez la souche entéroagrégative *E. coli* O42. Pet est une protéine sécrétée de 108 kDa encodée sur un plasmide de virulence (Eslava, Navarro-Garcia *et al.*, 1998). Cette protéine est une entérotoxine induisant des altérations dans le cytosquelette des cellules épithéliales intestinales et aurait un mode d'action intracellulaire (Navarro-Garcia, Canizalez-Roman *et al.*, 2001).

1.6.4.2.10 EaaA (EaaC)

EaaA a été identifié chez la souche ECOR-9 de la collection ECOR. Sa fonction est encore inconnue, mais on lui soupçonne un rôle dans la dégradation des immunoglobulines liées (Sandt et Hill, 2000). Cet autotransporteur est le seul SPATE à avoir été découvert chez une souche bactérienne commensale.

1.6.4.2.11 EatA

L'autotransporteur EatA a été identifié chez la souche entérotoxigène *E. coli* H10407 originellement isolée d'un patient ayant une diarrhée de type choléra sévère. Bien que sa fonction soit encore inconnue, il semble que ses effets soient similaires à ceux causés par SepA chez *Shigella flexneri*. Une délétion du gène *eatA* mène à une atténuation de la virulence chez *E. coli* (Patel, Dotson *et al.*, 2004).

Chapitre 2 : Article scientifique

2.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Concetta Restieri sous la supervision de Charles M. Dozois, Ph.D. Une partie du criblage phylogénétique a été effectué par Geneviève Garriss. Une partie du criblage des différents allèles d'*agn43* a été effectué par Marie-Claude Locas. L'article a été rédigé par Concetta Restieri et révisé par Charles M. Dozois.

2.1.1 Attestation des co-auteurs

De: Jenny Garriss [mailto:aykeena@hotmail.com]

Date: lun. 2006-08-21 15:32

A: Restieri, Concetta

Objet : RE: Article Scientifique Concetta Restieri

Je confirme que ma participation au projet de Concetta Restieri a bien été celle qui est mentionnée, soit une partie du criblage phylogénétique.

Geneviève Garriss

From: "Restieri, Concetta" <Concetta.Restieri@iaf.inrs.ca>

To: <aykeena@hotmail.com>,<micaude@hotmail.com>

Subject: Article Scientifique Concetta Restieri

Date: Sun, 20 Aug 2006 13:09:18 -0400

2.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Concetta Restieri sous la supervision de Charles M. Dozois, Ph.D. Une partie du criblage phylogénétique a été effectué par Geneviève Garriss. Une partie du criblage des différents allèles d'agn43 a été effectué par Marie-Claude Locas. L'article a été rédigé par Concetta Restieri et révisé par Charles M. Dozois.

Merci,

Concetta Restieri

De: Marie-Claude Locas [mailto:micaude@hotmail.com]
Date: dim. 2006-08-20 20:15
À: Restieri, Concetta
Objet : RE: Article Scientifique Concetta Restieri

J'atteste que ma participation à l'article scientifique de Concetta Restieri est bien celle mentionnée dans le texte ci-dessous.

Marie-Claude Locas

From: "Restieri, Concetta" <Concetta.Restieri@iaf.inrs.ca>
To: <aykeena@hotmail.com>, <micaude@hotmail.com>
Subject: Article Scientifique Concetta Restieri
Date: Sun, 20 Aug 2006 13:09:18 -0400

2.1 Contribution des auteurs à l'article

La majorité des travaux inclus dans l'article ont été effectués par Concetta Restieri sous la supervision de Charles M. Dozois, Ph.D. Une partie du criblage phylogénétique a été effectué par Geneviève Garriss. Une partie du criblage des différents allèles d'*agn43* a été effectué par Marie-Claude Locas. L'article a été rédigé par Concetta Restieri et révisé par Charles M. Dozois.

Merci,

Concetta Restieri

2.2 Accusé de réception

De: journalsrr@asmusa.org [<mailto:journalsrr@asmusa.org>]

Date: lun. 15/05/2006 12:39

À: Dozois, Charles

Objet : Manuscript submission (JCM01007-06 Version 1)

Dr. Charles M. Dozois
Inst. natl. de la recherche scientifique
Institut Armand-Frappier
531 boul. des Prairies
Laval, Quebec H7V 1B7
Canada

Re: Distribution of autotransporter encoding sequences among Escherichia coli clinical isolates and reference strains (JCM01007-06 Version 1)

Dear Dr. Dozois:

You have successfully submitted your manuscript via the Rapid Review system. The control number of your manuscript is JCM01007-06 Version 1. Take note of this number, and refer to it in any correspondence with the Journals Department or with the editor. You may log onto the Rapid Review system at any time to see the current status of your manuscript and the name of the editor handling it. The URL is <http://www.rapidreview.com/ASM2/author.html>, and your user name is dozois. To find contact information for the editor handling your manuscript, go to the following URL: <http://www.asm.org/journals/editors.asp>

In submitting your manuscript to the Journal of Clinical Microbiology (JCM), the author(s) guarantees that a manuscript with substantially the same content has not been submitted or published elsewhere and that all of the authors are aware of and agree to the submission.

By publishing in the journal, the authors agree that any DNAs, viruses, microbial strains, mutant animal strains, cell lines, antibodies, and similar materials newly described in the article are available from a national collection or will be made available in a timely fashion, at reasonable cost, and in limited quantities to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

Similarly, the authors agree to make available computer programs, originating in the authors' laboratory, that are the only means of confirming the conclusions reported in the article but that are not available commercially. The program(s) and suitable documentation regarding its (their) use may be provided by any of the following means: (i) as a program transmitted via the Internet, (ii) as an Internet server-based tool, or (iii) as

a compiled or assembled form on a suitable medium (e.g., magnetic or optical). It is expected that the material will be provided in a timely fashion and at reasonable cost to members of the scientific community for noncommercial purposes. The authors guarantee that they have the authority to comply with this policy either directly or by means of material transfer agreements through the owner.

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

If your manuscript is accepted for publication in a 2006 issue, page charges (subject to change without notice) will be assessed at \$65 per printed page for the first six pages and \$200 for each page in excess of six for a corresponding author who is an ASM member or \$75 per printed page for the first six pages and \$250 for each page in excess of six for a nonmember corresponding author. A corresponding author who is not a member may join ASM to obtain the member rate. If the research was not supported, you may send a request for a waiver of page charges to the Director, Journals. For more details, including type of articles not charged, see the Instructions to Authors.

IMPORTANT NOTICE: In the near future for its primary-research journals, ASM is going to post online PDF versions of manuscripts that have been peer reviewed and accepted but not yet copyedited. This new feature will be called "JCM Accepts" and will be accessible from the Journals website. The manuscripts will be published online as soon as possible after acceptance, on a weekly basis, before the copyedited, typeset versions are published. They will be posted "As Is" (i.e., as submitted by the authors at the modification stage), and corrections/changes will NOT be accepted. Accordingly, there may be differences between the JCM Accepts version and the final, typeset version. The manuscripts will remain listed on the JCM Accepts page until the final, typeset versions are posted, at which point they will be removed from the JCM Accepts page and will be available only through links from the final, typeset version. They will be under subscription access control until 6 months after the typeset versions are posted, when access to all forms becomes free to everyone. Any supplemental material intended, and accepted, for publication will not be posted until publication of the final, typeset article.

Thank you for submitting your manuscript for consideration.

Tasha Thomasian
Production Editor
Journal of Clinical Microbiology (JCM)

**2.3 Distribution of autotransporter genes among extraintestinal isolates of
Escherichia coli and the ECOR-Collection.**

Concetta Restieri, Geneviève Garriss, Marie-Claude Locas, Charles M. Dozois*

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

*Corresponding Author:

Charles M. Dozois

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, CANADA H7V 1B7

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

E-Mail: charles.dozois@iaf.inrs.ca

2.4 Résumé

Les autotransporteurs sont des protéines sécrétées contribuant à la virulence de plusieurs agents pathogènes Gram négatifs. Plusieurs autotransporteurs ont été identifiés parmi des souches d'*Escherichia coli* associées aux infections extraintestinales humaines et animales. L'utilisation d'une méthode de PCR multiplexe a permis de détecter la présence de 13 différentes séquences encodant des autotransporteurs (11 autotransporteurs sérine protéase (SPATEs), antigène 43 (Ag43), et AIDA-I) parmi 491 souches d'*E. coli* provenant d'infections du tractus urinaire humain, d'infections intestinales humaines, d'infections extraintestinales aviaires, et de la collection de référence ECOR. La distribution de cinq différents variants alléliques d'Ag43 a aussi été étudiée chez ces souches. *vat*, *sat* et *pic* ont été associés aux souches provenant d'infections du tractus urinaire et étaient identifiés principalement chez les souches appartenant au groupes phylogénétiques B2 et D. Chez les souches pathogènes aviaires (APEC), les séquences *tsh*, *vat* et *agn43* étaient associées aux souches les plus virulentes, alors que la séquence *sat* était complètement absente de ce groupe de souches. Les séquences *sepA*, *espC* et *espP* étaient associées aux souches intestinales et étaient très peu (ou pas) retrouvées chez les souches commensales et extraintestinales. Les séquences d'*agn43* étaient présentes chez 94% des souches urinaires comparativement à seulement 56% chez les souches commensales de la collection ECOR. Les séquences encodant les variants alléliques spécifiques d'*agn43* étaient aussi distribuées de façon phylogénétique, et les souches provenant du groupe clonal B2 contenaient plus souvent des multiples allèles d'*agn43*. Globalement, la présence des séquences spécifiques d'autotransporteurs parmi les souches étudiées était associée à la phylogénie et/ou la provenance de ces souches.

2.5 Abstract

Autotransporters are secreted proteins that contribute to the virulence of many Gram-negative pathogens. Various autotransporters have been identified among *Escherichia coli* isolates associated with intestinal or extraintestinal infections of humans and other animals. By using multiplex PCR assays, we specifically detected the presence of 13 different autotransporter encoding sequences (11 different serine protease

autotransporters of the *Enterobacteriaceae* (SPATEs), antigen 43 (Ag43), and AIDA-I among 491 *E. coli* isolates from urinary tract or intestinal infections of humans, extraintestinal infections of poultry, and *E. coli* reference strains belonging to the ECOR collection. The distribution of five different allelic variants of Ag43 was also assessed among isolates. *vat*, *sat*, and *pic* were associated with urinary tract isolates and were predominantly identified in isolates belonging to either phylogenetic groups B2 or D. In avian pathogenic *E. coli* (APEC), *tsh*, *vat* and *agn43* sequences were associated with virulence of the isolates, whereas *sat* was absent from APEC. By contrast, *sepA*, *espC*, and *espP* were associated with diarrheagenic *E. coli* and were largely absent from commensal and extra-intestinal isolates. *agn43* sequences were present in 94% of urinary tract isolates compared to only 56% of commensal strains from the ECOR collection. Specific *agn43* allelic variants were also phylogenetically distributed, and strains belonging to phylogenetic group B2 more commonly contained multiple *agn43* alleles. Overall, the presence of specific autotransporter sequences among strains was associated with the phylogenetic background and/or the source of the strains.

2.6 Introduction

Escherichia coli is a commensal resident of the intestine as well as a pathogen causing various diseases of humans and animals (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Kaper, Nataro *et al.*, 2004). *E. coli* can be grouped into 3 major categories: diarrheagenic *E. coli*, commensal *E. coli*, and extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) (Kaper, Nataro *et al.*, 2004 ; Russo et Johnson, 2003). Diarrheagenic *E. coli* cause different types of diarrheal diseases and are one of the most important enteric bacterial pathogens (Nataro et Kaper, 1998). Commensal *E. coli* strains are members of the normal intestinal flora of humans, other mammals, and birds (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Russo et Johnson, 2003). Certain commensal intestinal isolates are capable of causing infections in extraintestinal tissues, and these pathogenic strains have been collectively termed ExPEC (Russo et Johnson, 2000). Among ExPEC, uropathogenic *E. coli* (UPEC) is the most common cause of human urinary tract infections (UTIs) (Marrs, Zhang *et al.*, 2005 ; Russo et Johnson, 2003). Avian pathogenic *E. coli* (APEC) share some virulence traits with ExPEC from human infections and are associated with extraintestinal infections of

poultry, such as airsacculitis, pericarditis, cellulitis and septicaemia (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999 ; Rodriguez-Siek, Giddings *et al.*, 2005a ; Ron, 2006). The ECOR collection comprises 72 *E. coli* strains isolated from humans and other mammals from diverse geographic areas, and represents some of the clonal diversity of *E. coli* (Ochman et Selander, 1984). Phylogenetic analyses based on the ECOR collection have classified *E. coli* into four major clonal groups: A, B1, B2 and D (Herzer, Inouye *et al.*, 1990 ; Ochman et Selander, 1984). ExPEC strains commonly belong to phylogenetic group B2 and contain numerous virulence determinants implicated in extraintestinal infections (Escobar-Paramo, Clermont *et al.*, 2004 ; Picard, Garcia *et al.*, 1999). In addition some ExPEC strains belong to phylogenetic group D, and generally contain less of the characteristic virulence factors associated with ExPEC strains belonging to group B2 (Escobar-Paramo, Clermont *et al.*, 2004 ; Picard, Garcia *et al.*, 1999). Strains from groups B1 and A are rarely associated with extraintestinal infections and commonly contain commensal strains (Escobar-Paramo, Clermont *et al.*, 2004 ; Picard, Garcia *et al.*, 1999). Although certain diarrheagenic *E. coli* pathotypes belong to restricted clonal groups, globally, in contrast to ExPEC, diarrheagenic *E. coli* are more phylogenetically dispersed, and can belong to any of the *E. coli* phylogenetic groups (Escobar-Paramo, Clermont *et al.*, 2004).

Autotransporters are a family of secreted proteins from Gram-negative bacteria that direct their own secretion across the outer membrane (this secretion mechanism has also been described as type V secretion) (Dutta, Cappello *et al.*, 2002 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Autotransporters all possess the same general structure, but have many different functions or roles in virulence (Dutta, Cappello *et al.*, 2002 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Autotransporter proteins have three domains: an amino-terminal leader peptide (which initiates transport of the precursor across the inner membrane), an α - or passenger domain (which confers the function of the secreted protein) and a carboxy-terminal domain (the β -domain) that mediates secretion through the outer membrane (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). The passenger domain can either be released at the surface of the outer membrane or remain associated with the bacterial cell surface (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). The SPATEs (for Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*) include adhesins, toxins, and proteases

that can contribute to virulence of different *E. coli* pathotypes (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). No SPATES are present in *E. coli* K-12 strains, and with the exception of *eaaA* (*eaaC*) (Sandt et Hill, 2000), SPATE encoding genes have not been specifically identified in non-pathogenic *E. coli* (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Currently, with the exception of *vat* and *pic* (Parham, Pollard *et al.*, 2005a ; Parham, Pollard *et al.*, 2005b), thus far, the specific distribution of SPATE encoding genes among a diversity of *E. coli* isolates has not been investigated.

In addition to SPATES, other autotransporters identified in *E. coli* include AIDA-I and antigen 43 (Ag43). AIDA-I and Ag43 are autotransporters that undergo glycosylation by heptosyl transferases, and this glycosylation effects the capacity of these autotransporters to mediate adherence to eukaryotic cells (Sherlock, Dobrindt *et al.*, 2006 ; Sherlock, Schembri *et al.*, 2004). In addition, both AIDA-I and Ag43 contribute to bacterial intercellular aggregation and biofilm formation (Danese, Pratt *et al.*, 2000 ; Schembri, Hjerrild *et al.*, 2003 ; Sherlock, Schembri *et al.*, 2004). AIDA-I was originally identified in diffusely adhering diarrheagenic *E. coli* strains and is also produced by some *E. coli* strains associated with edema disease and diarrhea in pigs (Benz et Schmidt, 1992 ; Niewerth, Frey *et al.*, 2001). Ag43 is a common phase variable surface protein on many *E. coli* strains and it is encoded by the *flu* (*agn43*) gene in *E. coli* K-12 (Danese, Pratt *et al.*, 2000 ; Diderichsen, 1980 ; Henderson et Owen, 1999). Ag43 is a highly expressed protein, can be present in numerous chromosomal copies in certain strains, and at least five allelic variants have been identified among *E. coli* strains (Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004 ; Roche, McFadden *et al.*, 2001). Although Ag43 has been reported to be expressed by many *E. coli* strains, the distribution of sequences encoding Ag43 and its specific allelic variants among a diversity of *E. coli* strains has not been investigated.

In this study, we developed multiplex PCR assays to detect autotransporter genes among *E. coli* isolates from the ECOR collection and from various pathologies in humans and poultry. We determined the presence of sequences encoding 11 SPATES (Tsh, Vat, Sat, Pic (PicU), SigA, SepA, EspP (PssA), EspC, Pet, EaaA (EaaC) and EatA) and two other *E. coli* autotransporters (Ag43 and AIDA-I). In addition, among these isolates, we also determined the presence of sequences encoding five known variants of Ag43: K12

(*flu*) RS218, EDL933 (also called Cah (Torres, Perna *et al.*, 2002)), CFT073a and CFT073b.

2.7 Materials and Methods

Bacterial strains and sample preparation. The ECOR collection comprises 72 strains, including 61 fecal isolates from mammals, 10 UTI isolates and 1 asymptomatic bacteriuria isolate (Ochman et Selander, 1984). *E. coli* clinical isolates examined included 73 ExPEC isolates from urinary tract infections or urosepsis (kindly provided by James R. Johnson, VA Medical Center, Minneapolis, Minnesota) (Johnson, Russo *et al.*, 2000 ; Johnson, Stell *et al.*, 2002). Twenty-three diarrheagenic *E. coli* belonging to various pathotypes (12 ETEC, 6 EPEC and 5 EHEC) were kindly provided by J. M. Fairbrother (Fac. Vet. Med., Univ. of Montreal). 323 APEC included 295 isolates from France and Canada (Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000) and 28 isolates from Italy (Giovanardi, Campagnari *et al.*, 2005) that were provided by M. Moulin-Schouleur (INRA-Tours, France) and L. Sperati Ruffoni (Laboratorio Tre Valli, Verona, Italy) respectively. Strains were stored at -80°C in 20% glycerol following overnight culture in tryptic soy broth. Strains were cultured on Luria-Bertani (LB) agar plates to isolate colonies. Overnight cultures grown at 37°C in LB broth were then used to obtain DNA samples for PCR assays. Bacterial DNA samples were obtained by alkaline lysis. Briefly, 125 µl of an overnight culture were centrifuged and the medium was removed from the pellet. The cells were suspended in 25 µl of 0.5 N NaOH and incubated at room temperature for 5 minutes. A 25 µl volume of 1M Tris-buffer (pH 7.5) was added to neutralize pH, and 450 µl of water was then added to each sample. All lysates were conserved at -20°C.

The phylogenetic group (A, B1, B2 and D) of strains was either previously known by MLEE (Ochman et Selander, 1984) or determined by a triplex PCR method, which uses phylogenetic group specific primers for two genes (*chuA* and *yjaA*) and an anonymous DNA fragment (*tspE4C2*), coupled with a dichotomous decision tree (Clermont, Bonacorsi *et al.*, 2000). Samples that are positive for *chuA* and *yjaA* are classed as group B2. Samples testing positive for *chuA* and negative for *yjaA* are classed as group D. Samples testing negative for *chuA* and positive for *tspE4C2* are classed as group B1, whereas samples testing negative for *chuA* and *tspE4C2* are classed as group A.

Primer and assay design. Primers, the sequences they were derived from, and positive control strains used for PCR reactions are presented in Table 2.1. Primers were designed and verified for specificity by comparative sequence analysis using sequence databases including Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and *coli*BASE, an online database for comparative genomics of *E. coli* and related Enterobacteria (<http://colibase.bham.ac.uk/>) (Chaudhuri, Khan *et al.*, 2004). Primers were designed to have similar melting temperatures (60–64°C) and to amplify products of varying sizes to permit use of mixtures of primer pairs and simultaneous detection of different PCR products in multiplex reactions. A number of different alleles encoding variants of Ag43 have been described among *E. coli* strains (Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004) (Fig. 2.1). For analysis of sequences encoding five different variants of *agn43*, allelic variants were analyzed and primer pairs specific to five distinct alleles were developed (Fig. 2.1). Positive controls were as follows: *agn43K12* (*E. coli* MG1655), *agn43RS218* (*E. coli* RS218), *agn43aCFT073* and *agn43bCFT073* (*E. coli* CFT073), and *agn43EDL933* (*E. coli* EDL933). The specificity of each of these primer pairs was confirmed by failure to amplify products from control strains known to possess the other *agn43* allelic variants. In addition, the strains used for detection of the 5 specific *agn43* alleles were used as positive controls for testing of a conserved *agn43* primer pair which was designed to amplify all known copies of *agn43* alleles (Fig. 2.1). For all primer sets, with the exception of *agn43* and *agn43K12*, *E. coli* K-12 strain MG1655 was used as the negative control. For the multiplex PCR assays, six sets of multiplex reactions using 3 different primer pairs each were used to screen samples. Specific multiplex sets targeting the different autotransporter sequences were as follows. M1: *tsh*, *vat*, *sat*; M2: *espP*, *sigA*, *sepA*; M3: *espC*, *agn43*, *eatA*; M4: *pet*, *aida-I*, *eaa4*; M5: *agn43K12*, *pic*, *agn43EDL933*; M6: *agn43RS218*, *agn43aCFT073*, *agn43bCFT073*. Each multiplex set was then tested and the PCR conditions were adjusted to yield optimal simultaneous amplification of each of the target products.

Multiplex PCR conditions. Amplification reactions were done in a 50 µl volume containing 1 µl to 10 µl of template DNA, 0.2 mM of dNTPs (Invitrogen), varying concentrations of each primer set (Table 1), and 1 unit of TaqDNA Polymerase (New England Biolab) in 1 X Thermopol Reaction Buffer (NEB). Reactions were performed in

an automated thermal cycler (MasterCycler, Eppendorf). The reaction was heated to 95°C for 1 minute as a hotstart. This was followed by 30 cycles of denaturing (95°C for 1 min), annealing (58°C for 1 min) and extension (72°C for 1 min 20s), and a final extension (72°C for 10 min). Samples were then electrophoresed in 1% agarose gels, stained with ethidium bromide, and were visualised with an ultraviolet trans-illuminator and a Chemigenius² Bioimaging system (Syngene).

Southern Blot. Probes were synthesized with the PCR-DIG Labelling Mix (Roche, Mannheim, Germany) in a 100 µl reaction containing 1 µl of template DNA, 0.12 mM of dNTP PCR-DIG Labelling Mix, 0.08 mM of dNTPs (Invitrogen), 0.25 µM of each primer and 2 units of Taq DNA Polymerase (NEB) in 1 X Thermopol Reaction Buffer (NEB). The reactions were performed as described for the multiplex PCR conditions. Total bacterial genomic DNA was prepared using a standard protocol (Ausubel, Brent *et al.*, 1991). Restriction enzymes (HindIII and BamHI from Promega) were used according to the manufacturer's guidelines. Digested genomic DNA was electrophoresed in a 0.7% agarose gel. Native plasmids were isolated as described by Kado and Liu (Kado et Liu, 1981) and separated by pulsed-field gel electrophoresis. After electrophoresis, digested genomic DNA and plasmids were transferred to positively charged nylon membranes (Roche, Mannheim, Germany) by capillary transfer and probes were hybridized according to the Roche Applied Science DIG Application Manual for Filter Hybridization. Chemiluminescent detection was performed using CDP-Star (Roche, Mannheim, Germany) according to the manufacturer's guidelines. The light emission signal was captured and analyzed with a Chemigenius² Bioimaging system (Syngene).

Statistical analyses. Statistical analyses were performed with the Prism version 4.0 software package (GraphPad Software Inc) using a two-tailed Fisher's exact test.

2.8 Results

Validation of multiplex PCR assays. Validation of the primer sets and optimization of the primer concentrations used for the assays were determined using positive and negative amplification controls (presented in Table 2.1). Following optimization of the conditions for the assay, all primers used in the six different multiplex reaction sets amplified

specific products of the expected sizes (Fig. 2.2). In addition, no non-specific bands were visualised with any of the control strains used.

Distribution of autotransporters among the ECOR collection. To investigate whether the distribution of specific autotransporter sequences was associated with certain phylogenetic groups, we screened strains belonging to the ECOR collection (Fig. 2.3). Results indicate that certain autotransporter sequences were more common among particular clonal groups than among others. Most notably, *vat* sequences were present in all of the B2 group strains, with the exception of strain ECOR-65, and were only found in two non-B2 strains (ECOR-13 and ECOR-40). In addition, *sat* sequences were present in one cluster of the group D strains and in one cluster of the B2 group strains, but were only found in two other strains belonging to phylogenetic group A (ECOR-11 and ECOR-24). *pic* sequences were also mostly present among one cluster of 6 strains belonging to phylogenetic group B2. The only other SPATE encoding sequence that was phylogenetically distributed was *eaaA* (*eaaC*), which was limited to 4 strains belonging to a cluster in phylogenetic group A. None of the strains in the ECOR collection was positive for amplification of *pet* or *aida-I* specific sequences. All other SPATE encoding sequences identified were absent from phylogenetic groups B2 and D, but were identified in at least one of the ECOR strains.

Among the ECOR collection, Ag43 encoding sequences represented the most common autotransporter sequence identified. 44 of the ECOR strains (61.1%) contained *agn43* sequences as assessed by using the Ag43 primer set that amplifies all five allelic variants of *agn43*. Strains which were negative for detection of any *agn43* alleles were mostly clustered together among groups of strains belonging to phylogenetic groups A and B1. In addition, a cluster of four group D strains (ECOR-38 to ECOR-41) were *agn43*-negative. Among the 44 *agn43*-positive strains, the *agn43K12* (*flu*) allele was the most common. The *agn43K12* allelic variant was identified in 37 isolates dispersed among the different phylogenetic groups. The *agn43aCFT073* allele was identified among 12 strains, most of which belonged to phylogenetic group B2. The *agn43bCFT073* allele was only identified among 8 strains, which all belonged to phylogenetic group B2. The *agn43RS218* allele was identified in 9 strains dispersed among phylogenetic groups, but was absent from strains belonging to phylogenetic group D. The *agn43EDL933* allele

was only present in strain ECOR-37. In addition, three strains, all of which belong to phylogenetic group A, were positive for presence of *agn43* sequences by amplification using the Ag43 “universal” primers, but were negative for amplification using any of the allelic variant-specific primers. Among the ECOR collection, 19 strains were positive for two or more *agn43* allelic variants. The presence of multiple *agn43* alleles was significantly associated with strains belonging to phylogenetic group B2 compared to strains that belonged to other phylogenetic groups ($P = 0.0034$).

Among the ECOR collection, 11 strains are urinary tract isolates, and the remaining 61 strains are commensal fecal isolates from humans and other mammals. When comparing the distribution of different autotransporter sequences among the UTI isolates and fecal isolates of the ECOR collection, the only autotransporter sequences that were significantly associated with the UTI isolates compared to the fecal isolates were *agn43* ($P < 0.0415$) and *agn43K12* ($P < 0.0067$). Specifically, 10 of 11 (91 %) of the urinary tract isolates contained *agn43K12* sequences, whereas only 27 of the 61 (44%) fecal isolates contained *agn43K12* sequences.

Distribution of autotransporter sequences among *E. coli* clinical isolates. To more extensively investigate the specific presence of autotransporter genes among *E. coli* clinical isolates, a set of 73 isolates from human urinary tract infections or urosepsis, 23 diarrheagenic *E. coli*, and 323 avian pathogenic *E. coli* (APEC) were investigated for the presence of specific autotransporter sequences. Comparison of the distribution of autotransporter genes by source indicated an association of particular autotransporter genes with certain groups of clinical isolates. Among the SPATE encoding autotransporters, three were significantly associated with UTI isolates: *sat* ($P < 0.0001$), *pic* ($P < 0.004$), and *vat* ($P < 0.02$) (Fig. 2.4). The most common SPATE encoding sequence identified among UTI isolates was *sat*, which was present in 56% of UTI isolates tested. Sequences specific to *vat* and *pic* were present in 42% and 21% of UTI isolates respectively. In addition, *pic*, *sat*, and *vat*, were absent from all of the diarrheagenic isolates tested. By contrast, the SPATE encoding sequences *espP*, *sepA*, and *espC* were associated with diarrheagenic isolates and were largely absent from any other group of strains (Fig. 2.4). The *tsh* specific sequence was significantly associated with APEC ($P < 0.0001$), and was present in 50% of APEC isolates. In addition, *vat*

sequences were present among 33 % of APEC isolates. Notably, compared to UTI isolates which commonly contained *sat* sequences, none of the APEC isolates were positive for *sat* (Fig. 2.4). Among all clinical isolates tested, four APEC isolates were *sigA*-positive, one APEC isolate was positive for the presence of *aida-1*, and none were positive for amplification of *pet*-, *eaa4*-, or *eat4*-specific sequences.

Among clinical isolates, Ag43 encoding sequences represented the most common autotransporter sequence identified. Presence of *agn43* sequences was most common among UTI isolates (94%), although it was also high among diarrheagenic *E. coli* (91%) (Fig. 2.4). 66% of APEC isolates contained *agn43* sequences, whereas 56% of the commensal fecal isolates contained *agn43* sequences. The *agn43K12 (flu)* allele was the most common allelic variant among isolates for each of the different groups of *E. coli* tested. Among the different allelic variants of *agn43*, *agn43aCFT073* and *agn43bCFT073* were associated with UTI isolates ($P < 0.0001$), and these *agn43* variants were largely absent from APEC and diarrheagenic *E. coli* (Fig. 2.4). By contrast, *agn43RS218* and *agn43EDL933* variants were associated with diarrheagenic *E. coli* ($P < 0.002$ and $P < 0.0004$, respectively), and the *agn43EDL933* allele was almost exclusive to diarrheagenic isolates (Fig. 2.4). Among clinical isolates, 25 strains, most of them classed as phylogenetic groups A or B1, were positive for presence of *agn43* sequences by amplification using the Ag43 “universal” primers, but were negative for amplification using any of the allelic variant-specific primers.

Analysis of strains belonging to the ECOR collection for distribution of autotransporter sequences suggested a possible association of certain autotransporters with particular phylogenetic groups (Fig. 2.3). Analysis of commensal, urinary tract, and avian pathogenic *E. coli* isolates classified by phylogenetic group further illustrates the phylogenetic association of some autotransporter sequences among *E. coli* isolates (Table 2.2). Among each of these groups of isolates, *vat* sequences were always highly associated with strains belonging to phylogenetic group B2. In contrast to commensal and urinary tract isolates, *vat* sequences were also identified in 39% of APEC isolates that were classed as phylogenetic group D (Table 2.2). For the commensal strains and urinary tract isolates, *pic* sequences were more prevalent among phylogenetic group B2, whereas in APEC isolates *pic* sequences were associated with phylogenetic group D. For both

commensal strains and urinary tract isolates, *sat* sequences were associated with phylogenetic group B2. Among commensal strains, the *agn43* allele in general was associated with strains belonging to phylogenetic group B2. However, *agn43* was not specifically associated with a particular phylogenetic group among urinary tract or APEC isolates. The *agn43* allelic variants, *agn43bCFT073* and *agn43aCFT073* were more prevalent among commensal strains and urinary tract isolates from phylogenetic group B2, whereas in urinary tract isolates *agn43K12* was associated with phylogenetic group D ($P < 0.0001$). Among APEC, no specific *agn43* allelic variants were associated with strains belonging to particular phylogenetic groups.

Association of autotransporter sequences with virulence of APEC. Among the APEC strains tested, 295 isolates were previously classed for virulence based on lethality for 1-day-old chickens (Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000). Presence of autotransporter genes among APEC belonging to different lethality classes demonstrated that *tsh* and *vat* sequences were highly associated with high virulence lethality class 1 (LC1) isolates. In addition, *agn43* and the specific *agn43K12* allele were associated with high (LC1) and moderately virulent (LC2) APEC, compared to isolates of low virulence (LC3) (Fig. 2.5).

Genomic location of *vat* and *tsh* sequences among avian pathogenic *E. coli*. Tsh and Vat are two closely related SPATEs that were originally identified in APEC (Parreira et Gyles, 2003 ; Provence et Curtiss, 1994). These proteins share 78% identity at the amino acid level and regions of high nucleotide identity. Thus far, *tsh* has been characterized as a plasmid encoded SPATE in either APEC or human isolates (Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000 ; Johnson, Siek *et al.*, 2006 ; Otto, van Dooren *et al.*, 1998). By contrast, *vat* is present on genomic islands among human UTI (Dobrindt, Blum-Oehler *et al.*, 2001 ; Welch, Burland *et al.*, 2002) and APEC (Parreira et Gyles, 2003) isolates. Among the ECOR collection, which contains *E. coli* isolated from humans and other mammals, and among *E. coli* urinary tract isolates, *vat* sequences are predominantly associated with strains belonging to phylogenetic group B2 (Fig. 2.3, Table 2.2) (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). However, in contrast to *E. coli* isolates from mammals, APEC strains classed as phylogenetic group D also commonly contained *vat* sequences. The localisation of both *vat* and *tsh* specific sequences among APEC was assessed to determine if there were any differences in localisation of these SPATE genes among APEC from different

phylogenetic backgrounds. Regardless of phylogenetic group, among all APEC strains tested, *tsh*-hybridizing sequences were always associated with plasmids, whereas *vat*-hybridizing sequences never hybridized to plasmid DNA, but hybridized to total genomic DNA (supplementary information).

2.9 Discussion

Numerous autotransporter proteins including a variety of SPATEs, antigen 43, and AIDA-I have been identified among pathogenic *E. coli* strains associated with either enteric or extraintestinal infections in humans and other animals (Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004). Most of the characterized autotransporters were initially identified in pathogenic *E. coli* strains and, with the exception of antigen 43, autotransporters are absent from *E. coli* K-12 strains. Despite the absence of autotransporter genes from *E. coli* K-12, suggesting a potential virulence-associated role for these proteins among pathogenic strains, the presence of most autotransporter encoding genes has not been extensively investigated among *E. coli* strains belonging to different phylogenetic groups or *E. coli* pathotypes. With the aim of investigating the distribution of different autotransporter encoding sequences among a diversity of *E. coli* strains, we designed primers to specifically detect 11 of the known SPATE-encoding sequences, AIDA-I, and Ag43. The diversity of *E. coli* was represented by the ECOR collection (which contains 61 commensal fecal isolates from mammals and 11 urinary tract isolates); *E. coli* isolated from extraintestinal infections in humans and poultry, as well as a small subset of diarrheagenic *E. coli* isolates. Our results demonstrate that the presence of autotransporter sequences among *E. coli* strains is associated with certain phylogenetic groups and/or pathotypes (Figs. 2.3 and 2.4, Table 2.2).

The most common autotransporter sequence we identified among strains was *agn43*. Since antigen 43 is present in *E. coli* K-12, and a number of allelic variants of this surface protein have been identified among different *E. coli* strains (Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004 ; Roche, McFadden *et al.*, 2001), it is not surprising that *agn43* sequences are widely distributed among a diversity of *E. coli* strains. Ag43 is encoded by the *flu* gene (or *agn43*) and is a member of the AIDA autotransporter family (Diderichsen, 1980 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004). It is a major self-

recognizing surface antigen in *E. coli* (Diderichsen, 1980 ; Roche, McFadden *et al.*, 2001). The Ag43-Ag43 interaction is responsible for autoaggregation of bacterial cells and Ag43 is implicated in biofilm formation (Danese, Pratt *et al.*, 2000 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004). From the five known variants of Ag43 some have lost their self-recognizing function (variants from *E. coli* CFT073 and *E. coli* RS218), but all of them are able to promote biofilm formation (Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004). The presence of *agn43* is thought to be well conserved in *E. coli*, and various studies have shown that some clinical isolates possess several copies of this gene (Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004 ; Roche, McFadden *et al.*, 2001). According to our results, 71% of the 491 strains screened were positive for the presence of an *agn43* allele and 21% contained two or more different alleles. The general presence of *agn43* sequences was widely distributed among both commensal and pathogenic strains belonging to different phylogenetic groups. However, *agn43* sequences were not ubiquitous, and were present in only 56% of the commensal isolates from the ECOR collection (Table 2.2). Interestingly, *agn43* sequences were present in over 90% of the urinary tract isolates as well as diarrheagenic *E. coli* strains tested. These results suggest an increased association of *agn43* sequences among pathogenic *E. coli* compared to commensal *E. coli* strains. Of further note, pathogenic strains commonly contained multiple allelic variants of *agn43* sequences. Different *agn43* alleles confer distinct surface properties to *E. coli*, such as increased adherence to host cells or increased intercellular aggregation and biofilm production (Klemm, Hjerrild *et al.*, 2004 ; Sherlock, Dobrindt *et al.*, 2006). It may therefore be beneficial for pathogenic *E. coli* to express different variants of Ag43 to provide a more adaptive advantage for colonisation and survival during infection of the host or persistence in other environments.

Regarding detection of specific allelic variants of *agn43*, the *agn43K12* variant was the most common and widespread allele, and was distributed among all phylogenetic groups. By contrast, other allelic variants were less common and some were restricted to specific phylogenetic groups. For instance, the *agn43bCFT073* allele was only identified in a subset of strains classed as phylogenetic group B2 among the ECOR collection and UTI isolates (Fig. 2.3, Table 2.2). Similarly, among all isolates tested, the *agn43EDL933* allele was almost exclusive to diarrheagenic *E. coli* (Fig. 2.4), and was only detected in

one APEC strain and one member of the ECOR collection (ECOR-37). Interestingly, ECOR-37, a commensal O55:H7 strain is phylogenetically related to enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) O157:H7 strain EDL933 (Escobar-Paramo, Clermont *et al.*, 2004) and it has been postulated that EHEC evolved from an O55:H7 enteropathogenic *E. coli* (Feng, Lampel *et al.*, 1998). Therefore, the presence of certain *agn43* allelic variants such as *agn43EDL933* and *agn43bCFT073* may be phylogenetically restricted and of epidemiological value for determining phylogenetic relationships among *E. coli* strains.

The presence of SPATE encoding sequences among *E. coli* strains was also associated with certain phylogenetic groups and/or pathotypes. Analysis of the ECOR collection indicated that the presence of *vat* and *pic* sequences was higher among strains belonging to phylogenetic group B2, whereas *sat* sequences were associated with strains belonging to clusters of strains from either phylogenetic groups B2 or D (Fig. 2.3). Interestingly, only *vat*, *sat*, and/or *pic* sequences and none of the other SPATE encoding sequences were identified among all of the strains belonging to phylogenetic groups B2 or D of the ECOR collection. ECOR strains belonging to group B1, rarely contained SPATE encoding sequences, whereas strains belonging to phylogenetic group A contained a diversity of SPATE encoding sequences (Fig. 2.3). In addition, the presence of *eaaA* (*eaaC*) sequences was specific to a cluster of strains from phylogenetic group A. *EaaA* was originally identified in human commensal fecal strain ECOR-9 (Sandt et Hill, 2000). *eaaA* appears to be the only SPATE identified that is specifically associated with human commensal isolates, as all 4 ECOR strains containing *eaaA* sequences were human commensal fecal isolates, and none of the other isolates tested from clinical cases in humans or poultry contained *eaaA* sequences.

Our results are globally in accordance with those of Parham *et al.* (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). By using degenerate primers designed to target conserved regions of β -domains from various SPATE encoding genes, Parham *et al.* (Parham, Pollard *et al.*, 2005b) determined that SPATE sequences were present mainly in strains belonging to phylogenetic groups B2 and D as well as one cluster of strains from phylogenetic group A (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). By using multiplex PCR detection of specific SPATE genes, we have determined which specific SPATE sequences are present among strains of the ECOR collection. Some discrepancies were observed between our results and those of

Parham *et al.* (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). By using specific primers, we identified SPATE sequences in 38 of the 72 ECOR strains compared to 29 SPATE-positive strains identified by Parham *et al.* (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). These differences may be due to a greater specificity of detection using gene-specific primers compared to the degenerate primers. Or in some cases may be the result of nucleotide differences or the presence of partial or disrupted genes that would result in conflicting results. Interestingly, for two strains, ECOR-65 and ECOR-48, which we determined to be negative for any of the 11 specific SPATE sequences (Fig. 2.3), Parham *et al.* identified SPATE sequences (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). This suggests that these two strains may potentially contain additional and perhaps currently uncharacterized SPATE encoding genes.

Comparison of the presence of SPATE sequences among commensal and clinical isolates indicated that *sat*, *vat*, and *pic* sequences were all significantly associated with UTI strains, whereas these SPATE encoding sequences were not present in the diarrheagenic strains that were analysed (Fig. 2.4). By contrast, although a limited number of diarrheagenic strains were tested, SPATE sequences associated with diarrheagenic *E. coli* included *sepA*, *espP*, and *espC*, which were largely absent from *E. coli* commensal strains or strains isolated from extraintestinal infections (Fig. 2.4). In addition, *tsh* sequences were highly associated with APEC strains and were rarely present among isolates from any other sources (Fig. 2.4, Table 2.2). These results globally suggest a pathotype-specific distribution of certain SPATEs among the *E. coli* strains tested. Indeed, *pic*, *vat*, and *sat* sequences have previously been shown to be associated with UTI isolates compared to commensal fecal isolates (Guyer, Henderson *et al.*, 2000 ; Heimer, Rasko *et al.*, 2004 ; Parham, Pollard *et al.*, 2005b ; Parham, Srinivasan *et al.*, 2004). However, based on our results, the increased presence of some SPATEs sequences among human UTI isolates may, at least in part, be attributed to the phylogenetic background of the strains. In general ExPEC isolates belong to groups B2 or D (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998 ; Picard, Garcia *et al.*, 1999), and most (87%) of the UTI isolates tested in our study belong to these phylogenetic groups (Table 2.2). In fact, no significant difference in the presence of *sat*, *pic*, or *vat* was found between UTI isolates belonging to groups B2 or D, compared with commensal isolates from groups B2 or D. In

addition to being identified among UTI isolates, *pic* and *sat* are also present in certain diarrheagenic *E. coli* pathotypes or *Shigella* spp. *Pic*, is a multifunctional SPATE which can degrade mucin, functions as a hemagglutinin, and contributes to serum resistance (Escobar-Paramo, Clermont *et al.*, 2004 ; Henderson, Czeczulin *et al.*, 1999). *pic* was initially identified in enteroaggregative *E. coli* (EAEC) O42 (Henderson, Czeczulin *et al.*, 1999), and is prevalent among EAEC (Vila, Vargas *et al.*, 2000) and in *Shigella flexneri* 2a strains (Noriega, Liao *et al.*, 1995). *Sat* was initially identified in uropathogenic *E. coli* CFT073 and is cytotoxic to kidney cells in experimental urinary tract infection (Guyer, Henderson *et al.*, 2000 ; Guyer, Radulovic *et al.*, 2002). However, in addition to being associated with UTI isolates, *sat* is also present in some *Shigella flexneri* and *Shigella sonnei* strains (Niyogi, Vargas *et al.*, 2004 ; Ruiz, Navia *et al.*, 2002), diffusely adhering *E. coli* (DAEC) (Taddei, Moreno *et al.*, 2003), and EAEC strains (Guyer, Radulovic *et al.*, 2002). Hence, *sat* and *pic* appear to be more widely distributed among commensal *E. coli* and different pathotypes of *E. coli-Shigella* than some other SPATEs. However, the presence of *sat* and *pic* sequences among commensal fecal isolates also suggests that these SPATEs are not likely to play a major role in directly eliciting enteric disease by diarrheagenic pathotypes.

Among all of the SPATE sequences, *vat* was clearly phylogenetically distributed, as nearly all strains classed as group B2, irrespective of their source, were *vat*-positive (Fig. 2.3, Table 2.2). Similarly, Parham *et al.* also observed an almost exclusive association of *vat* with strains belonging to the ECOR B2 phylogenetic cluster (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). *Vat* was initially identified as a vacuolating cytotoxin from APEC strains that was specific for avian but not mammalian cells (Salvadori, Yano *et al.*, 2001), and was found to contribute to the virulence APEC strain Ec222 in chickens (Parreira et Gyles, 2003). A homolog of *Vat* was also identified in UPEC strain CFT073, although it was first annotated as the SPATE protein *Tsh*, due to high sequence identity with *Tsh* (Heimer, Rasko *et al.*, 2004). *Tsh* and *Vat*, are of identical size and these proteins share 78% identity. However, unlike *Vat*, *Tsh* is not cytotoxic to avian cells (CL Gyles, personal communication), but functions as a hemagglutinin (Kostakioti et Stathopoulos, 2004 ; Provence et Curtiss, 1994), mucinase (Dutta, Cappello *et al.*, 2002), and hemoglobin protease (Otto, van Dooren *et al.*, 1998), and can also bind to fibronectin and

collagen IV (Kostakioti et Stathopoulos, 2004). In addition, *vat* is encoded on pathogenicity islands adjacent to the *thrW* tRNA gene in APEC strain Ec222 and UPEC strains CFT073 and 536 (Parham, Pollard et al., 2005b ; Parreira et Gyles, 2003), whereas *tsh* is typically encoded on large conjugative plasmids (Dozois, Dho-Moulin et al., 2000 ; Johnson, Siek et al., 2006 ; Otto, van Dooren et al., 1998). Our results further confirm that in APEC strains that were classed into different phylogenetic groups, *vat* was always encoded on the chromosome, whereas *tsh* was consistently localized to plasmids (supplementary information).

Both *tsh* and *vat* were found to be associated with APEC strains of high virulence in a day-old chick infection model (Fig. 2.5). This is in accordance with the roles of both of these SPATEs for virulence or development of lesions in chickens (Dozois, Dho-Moulin et al., 2000 ; Parreira et Gyles, 2003). Unlike *vat*, the presence of *tsh* sequences was limited among UTI isolates and the ECOR collection, but was common among APEC strains. The presence of *tsh* was not associated with a particular phylogenetic group (Table 2.2). The distribution of *tsh* among phylogenetic groups could be explained by the fact that this autotransporter is encoded on transmissible plasmids. In addition to the increased prevalence of *tsh* among APEC strains (Table 2.2), it is also interesting to note the complete absence of *sat* sequences and low prevalence of *agn43CFT073* alleles among APEC. Hence, despite the fact that some APEC strains share many characteristics with ExPEC strains associated with human disease (Rodriguez-Siek, Giddings et al., 2005a ; Ron, 2006), our results suggest that in general the APEC strains we tested also exhibit some distinct traits from *E. coli* UTI isolates. Similarly, unlike some common UTI pathotypes which contain genes coding for hemolysin, *hly*, and cytotoxic necrotizing factor, *cnf1*, (Marrs, Zhang et al., 2005), APEC nearly always lack these traits (Rodriguez-Siek, Giddings et al., 2005a). Therefore the possibility that APEC strains may be a vehicle for *E. coli* causing urinary tract infection or other extraintestinal infections in humans is likely to be only applicable to a limited subset of strains.

In summary, a multiplex PCR assay to screen for autotransporter genes in *E. coli* was developed and validated. With this method we confirmed that autotransporter genes are phylogenetically and pathospecifically distributed among the 491 *E. coli* strains studied. These results are in accordance with the finding that in *E. coli* the presence of certain

virulence genes is dependent on the genetic background and/or clinical origin of the strains (Feng, Lampel *et al.*, 1998). In the current work analysis of strains focused on the ECOR collection and mostly extraintestinal isolates from human UTIs or avian extraintestinal disease. It would be of further interest to examine a more extensive set of phylogenetically characterized clinical isolates from a variety of diarrheagenic *E. coli* from humans and animals to further determine the distribution of autotransporter genes among these *E. coli* pathotypes.

2.10 Acknowledgments

Kind thanks to J.R. Johnson, J. M. Fairbrother, L. Sperati Ruffoni, and J.P. Nataro for providing strains or plasmids. C. R. was funded by a Fondation Armand-Frappier scholarship. Funding for this project was provided by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR), the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC), the Canadian Foundation for Innovation, and the Canada Research Chairs programs.

2.11 References

Consulter les références générales du présent mémoire.

2.12 Tables and figures

Table 2.1. Primers for multiplex PCR and DNA probe synthesis.

Gene	Primer concentration (μM)	Primer sequence (5'-3')	length of product (bp)	Accession number ^a	Control strain	Reference
Autotransporter screening						
<i>tsh</i>	0.25	CCGTACACAAATACGACGG GGATGCCCTCGCAGCGT	304	AF218073	<i>E. coli</i> χ 7122	(Dozois, Dho-Moulin <i>et al.</i> , 2000)
<i>vat</i>	0.25	AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	420	AY151282	<i>E. coli</i> CFT073	(Parreira et Gyles, 2003)
<i>sat</i>	0.5	GGTATTGATATCTCCGTGAAC ATAGCCGCTGACATCAGTAAT	779	AE014075	<i>E. coli</i> CFT073	(Welch, Burland <i>et al.</i> , 2002)
<i>espP</i>	0.125	GTCCATCAGGGACATGCCA TCACATCAGCACCGTTCTAT	547	NC_002128	<i>E. coli</i> EDL933	(Makino, Ishii <i>et al.</i> , 1998)
<i>sigA</i>	0.125	ACAGGGTTACGGAGAGTGC TCCGGCAACGCCCTAACATT	674	NC_004337	<i>S. flexneri</i> 2a	(Jin, Yuan <i>et al.</i> , 2002)
<i>sepA</i>	0.125	GCAGTGGAAATATGATGCGGC TTGTTCATCGGAGAAAGAACG	794	AY604009	<i>S. flexneri</i> 2a	(Boerlin, Travis <i>et al.</i> , 2005)
<i>espC</i>	0.75	TAGTGCAGTGCAGAAAGCAGTT AGTTTCTCTTGTGCTGTATGCC	301	AF297061	<i>E. coli</i> E2348/69	(Mellies, Navarro-Garcia <i>et al.</i> , 2001)
<i>eat4</i>	0.75	CAGGAGTGGAAACATTAAGTCA CGTACGCCCTTGATTTCAGGAT	743	AY163491	<i>E. coli</i> H844-7056	(Patel, Dotson <i>et al.</i> , 2004)
<i>pet</i>	0.125	GGCACAGAATAAAGGGTGT CCTCTTGTTCACGACATAC	302	AF056581	<i>E. coli</i> O42	(Eslava, Navarro-Garcia <i>et al.</i> , 1998)
<i>eaaA</i>	0.875	ATCCGGTGTTTATCGTATGGG TACGGACTTCACTGAATGCC	830	AF151091	<i>E. coli</i> ECOR-9	(Sandt et Hill, 2000)
<i>pic</i>	0.25	ACTGGATCTAAGGCTCAGGAT GACTTAATGTCACTGTCAGCG	572	AF097644	<i>E. coli</i> CFT073	(Henderson, Czeczulin <i>et al.</i> , 1999)
<i>aida-1</i>	0.5	ACAGTATCATATGGAGCCACTC ^b TGTGCGCCAGAACTATTAAATGG ^b	587	X65022	<i>E. coli</i> 2787	(Benz et Schmidt, 1992)
<i>agn43</i>	0.06	CTGGAAACCGGTCTGCCCTT CCTGAACGCCAGGGTGATA	433	U24429	<i>E. coli</i> MG1655	(Henderson et Owen, 1999 ; Klemm, Hjerrild <i>et al.</i> , 2004)
<i>agn43K12</i> <i>(flu)</i>	0.25	CCGGCGGGCAATGGGTACA CAGCTCTCACAACTGGCGAC	386	U24429	<i>E. coli</i> MG1655	(Henderson et Owen, 1999)
<i>agn43</i> <i>EDL933</i> <i>(cah)</i>	0.5	CGTATCGCTGTGCCGATAAC CCGTATACGAGTTGTCAAATCA	707	AE005174	<i>E. coli</i> EDL933	(Perna, Plunkett <i>et al.</i> , 2001)
<i>agn43</i> <i>RS218</i>	0.375	CGGATTTCACCAACGTTAAC CATCCACCAGTGTTCAGG	240	AJ617685	<i>E. coli</i> RS218	(Schneider, Dobrindt <i>et al.</i> , 2004)
<i>agn43</i> <i>aCFT073</i>	0.25	AGGCAGGAGGAACTGCCAGT TAAATGAGGGTGTCCCGTGC	340	AE014075	<i>E. coli</i> CFT073	(Welch, Burland <i>et al.</i> , 2002)
<i>agn43</i> <i>bCFT073</i>	0.25	CAGCCGGATCTGCCGCACT ACTCTGGTGTTCCTGGCTGTT	440	AE014075	<i>E. coli</i> CFT073	(Welch, Burland <i>et al.</i> , 2002)
DNA probes						
<i>tsh</i>		GAAGTCTTGGGGAACGGTCAATA TTATCCAGATATGCCAGCCACT	406	AF218073	<i>E. coli</i> χ 7122	(Dozois, Dho-Moulin <i>et al.</i> , 2000)
<i>vat</i>		AACGGTTGGTGGCAACAATCC AGCCCTGTAGAATGGCGAGTA	420	AY151282	<i>E. coli</i> CFT073	(Parreira et Gyles, 2003)

^a Genbank database accession number.

^b Primers modified from Ngeleka *et al.*, 2003 (Ngeleka, Pritchard *et al.*, 2003).

Table 2.2. Distribution of the most common SPATE autotransporter sequences and *agn43* allelic variants among commensal, urinary tract and avian pathogenic *E. coli* isolates categorized by phylogenetic group^a.

N	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>pic</i>	<i>agn43</i>	Number positive for presence of autotransporter sequences (%)									
						<i>agn43</i> K12	<i>agn43</i> RS218	<i>agn43a</i> CFT073	<i>agn43b</i> CFT073	<i>agn43</i> EDL933					
ECOR commensal strains															
Phylogenetic group															
A	23	0	1 (4)	1 (4)	1 (4)	9 (39)	6 (26)	2 (9)	3 (13)	0					
B1	14	2 (14)	0	0	1 (4)	7 (50)	7 (50)	2 (14)	0	0					
B2	11	0	10 (91) ^f	3 (27)	6 (55) ^f	11 (100) ^r	7 (64)	2 (18)	4 (36)	6 (55) [*]					
D	9	0	0	5 (56) ^r	0	5 (56)	5 (56)	0	2 (22)	0					
E (non)	4	1 (25)	0	0	0	2 (50)	2 (50)	1 (25)	0	1 (25)					
Total	61	3 (5)	11 (18)	9 (15)	8 (13)	34 (56)	27 (44)	7 (11)	9 (15)	6 (10)					
UTI isolates															
Phylogenetic group															
A	8	2 (25)	0	1 (13)	0	5 (63)	5 (63)	0	0	0					
B1	3	0	0	1 (33)	1 (33)	3 (100)	2 (67)	1 (33)	1 (33)	0					
B2	37	1 (3)	34 (97) ^f	16 (43)	16 (43) ^f	37 (100)	29 (78)	7 (19)	22 (60) ^f	16 (43) ^f					
D	36	0	1 (3)	29 (81) ^f	1 (3)	34 (94)	34 (94) ^r	1 (3)	1 (3)	0					
Total	84	3 (4)	35 (42)	47 (56)	18 (21)	79 (94)	70 (83)	9 (11)	24 (29)	16 (19)					
APEC															
Phylogenetic group															
A	138	65 (47)	8 (6)	0	0	86 (62)	77 (56)	15 (11)	0	0					
B1	30	9 (30)	0	0	1 (3)	18 (60)	12 (40)	6 (20)	0	1 (3)					
B2	83	46 (55)	71 (86) ^f	0	12 (14)	61 (73)	54 (65)	15 (18)	3 (4)	2 (2)					
D	72	40 (56)	28 (39)	0	17 (24) ^f	49 (68)	44 (61)	7 (10)	2 (3)	2 (3)					
Total	323	160 (50)	107 (33)	0	30 (9)	214 (66)	187 (58)	43 (13)	5 (2)	4 (1)					
Total	484	160 (41)	107 (33)	0	30 (8)	214 (56)	187 (58)	43 (13)	5 (2)	1 (0)					

^a The number of strains containing sequences encoding other autotransporters was too low to perform statistical analysis. ^r P < 0.05; ^{*} P < 0.005; ^f P < 0.0005.

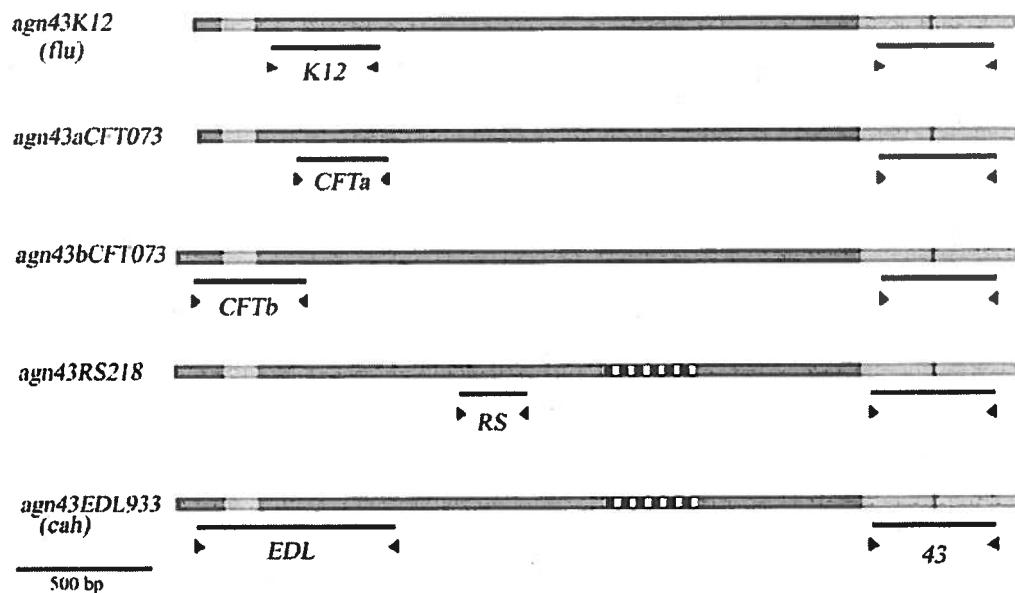


FIG 2.1: Schematic representation of the sequences encoding the five known variants of *agn43* and positions of the different primers (arrows) used for the PCR assays. Primers listed in Table 2.1 are represented by small arrows and respective PCR products by black lines; hatched regions indicate gaps; grey shaded zones represent highly conserved regions among the five alleles.

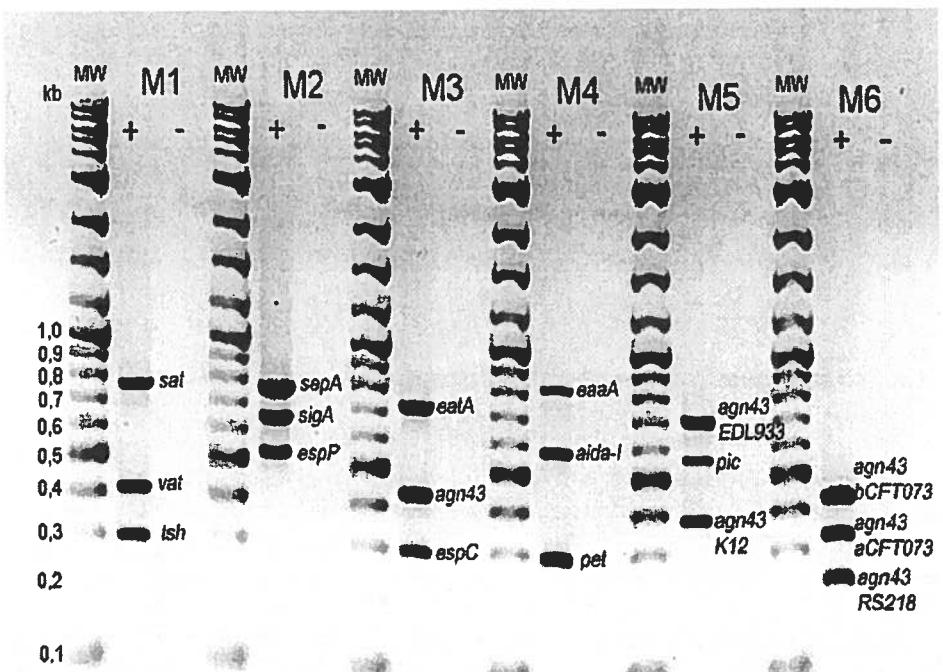


FIG 2.2: Validation of PCR assay sets. Agarose gel showing polymerase chain reaction (PCR) products amplified simultaneously from multiplex PCR assays in six separate reactions using primer pools M1-M6. MW, molecular weight standard; +, positive control DNA; -, negative control DNA.

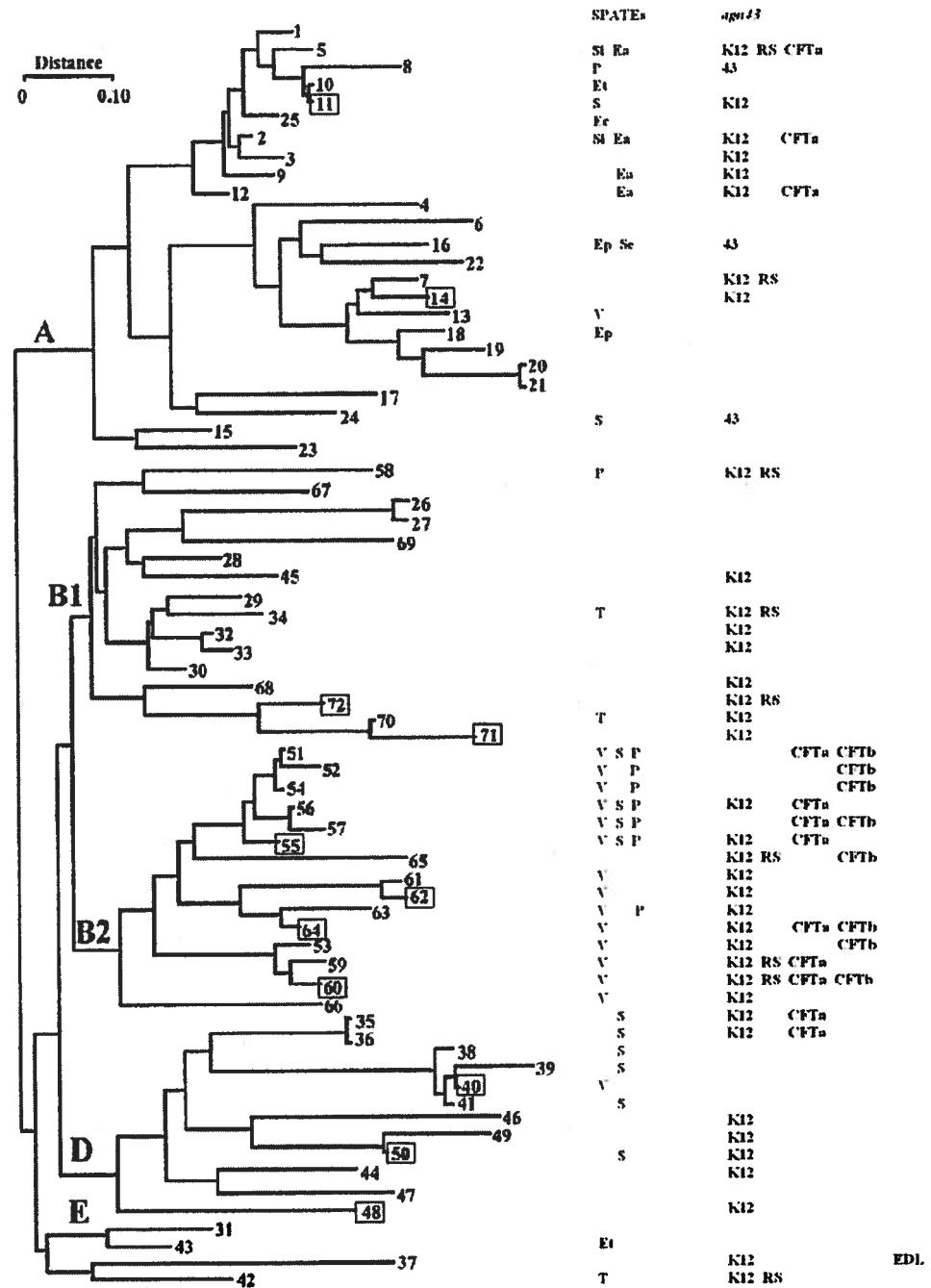


FIG 2.3: Distribution of SPATEs and *agn43* and allelic variants among the ECOR collection. T, *tsh*; V, *vat*; S, *sat*; P, *pic*; Ep, *espP*; Si, *sigA*; Se, *sepA*; Ec, *espC*; Ea, *eaaA*; Et, *eatA*; 43, *agn43*; K12, *agn43K12*; RS, *agn43RS218*; CFTa, *agn43aCFT073*; CFTb, *agn43bCFT073*; EDL, *agn43EDL933*. Framed strains were isolated from human urinary tract infections (ECOR-71 from asymptomatic bacteriuria). Figure adapted from Herzer *et al.*, 1990 (Herzer, Inouye *et al.*, 1990).

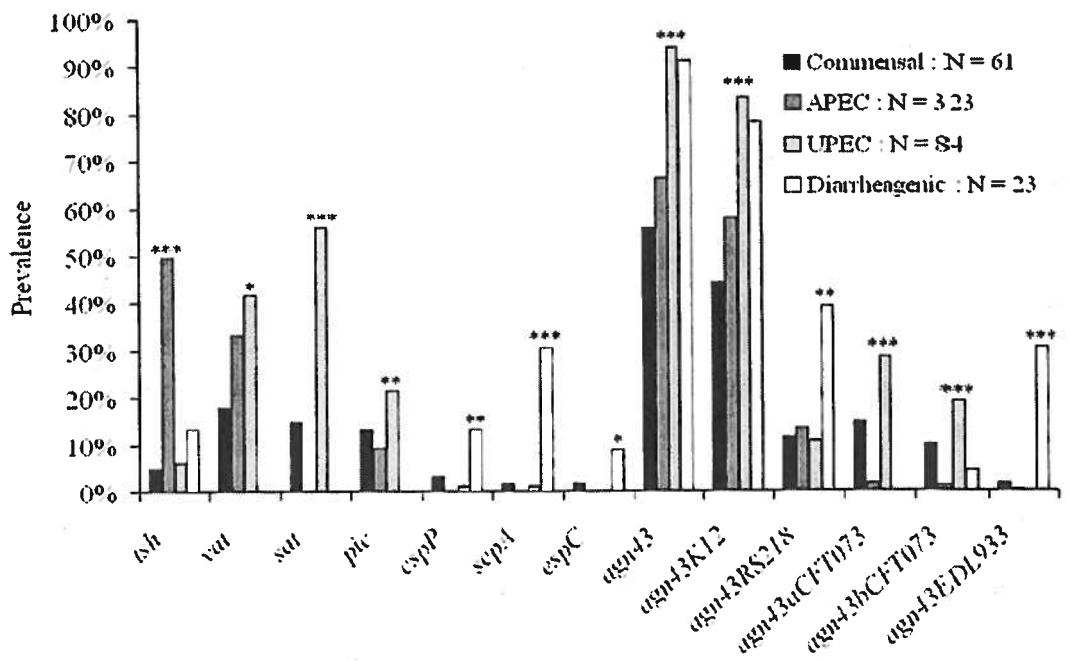


FIG 2.4: Prevalence of autotransporters in 491 *E. coli* strains. The sequences encoding autotransporters were detected by multiplex PCR. Prevalence is indicated as a percentage of the total population of strains associated with each pathospecific group. Commensal, commensal isolates from the ECOR collection; APEC, avian pathogenic *E. coli*; UPEC, uropathogenic *E. coli*; Diarrheagenic, diarrheagenic *E. coli*. *** $P < 0.0005$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$.

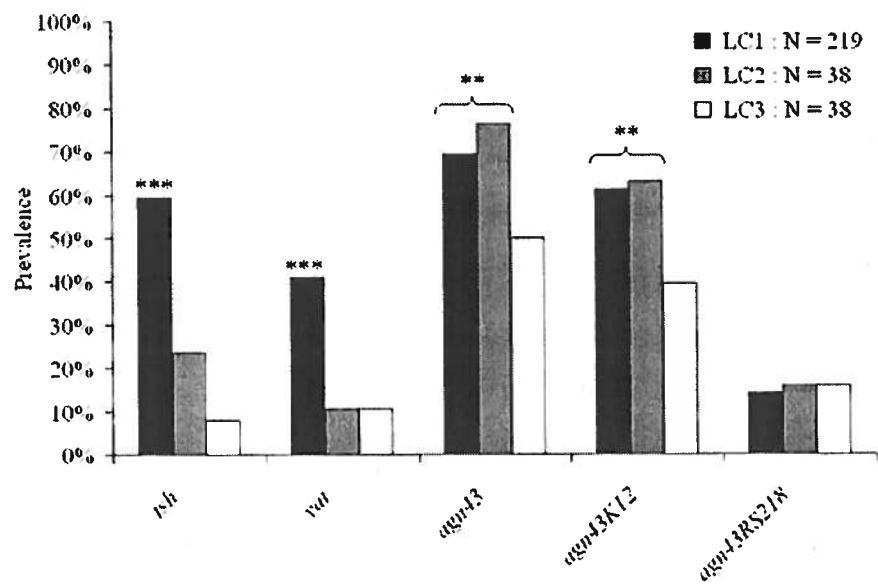
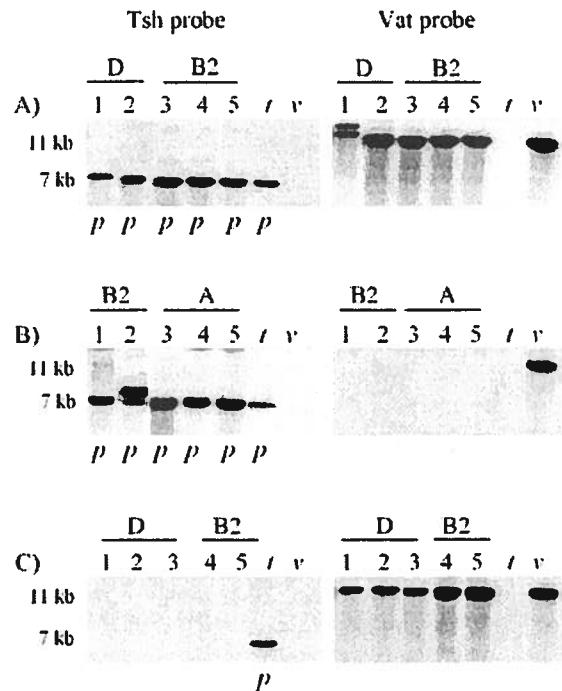


FIG 2.5: Prevalence of autotransporters in 295 APEC strains previously classified for virulence based on lethality for 1-day-old chickens (Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000). Lethality classes (LC) are defined as follows: LC1, 50% lethal dose (LD_{50}) $< 10^8$ CFU; LC2, $LD_{50} \geq 10^8$ CFU; LC3, not lethal at $\geq 10^8$ CFU. The sequences encoding autotransporters were detected by multiplex PCR. Prevalence is indicated as a percentage of the 295 APEC strains associated with each lethality class (LC). *** $P < 0.0005$; ** $P < 0.005$; * $P < 0.05$.

FIG 2.6: SUPPLEMENTAL MATERIAL



Supplemental figure: Typical results for Southern hybridization with the Tsh and Vat probes; A) Strains tested positive for the presence of both *vat* and *tsh* by PCR; B) Strains tested negative for *vat* and positive for *tsh* by PCR; C) Strains tested positive for *vat* and negative for *tsh* by PCR. Lanes 1 to 5, digested genomic extracts of clinical APEC isolates; lane *t*, digested genomic extract of *E. coli* CFT073 (*tsh* -, *vat* +); lane *v*, digested genomic extract of *E. coli* χ7122 (*tsh* +, *vat* -); *p*, indicates hybridization of Tsh probe with native plasmid DNA extracts. Phylogenetic groups of APEC strains are indicated above the lanes.

Chapitre 3 : Résultats supplémentaires

Parmi les souches d'*E. coli* criblées, certains gènes d'autotransporteurs furent peu ou pas détectés (figure 3.1). Le gène *sigA* a été retrouvé chez 4 souches APEC du groupe phylogénétique B2 et 2 souches de l'ECOR-Collection appartenant au groupe phylogénétique A. La présence du gène *eatA* a été constatée chez une (1) souche IPEC provenant du groupe phylogénétique B1 et 2 souches de l'ECOR-Collection du groupe phylogénétique A. Le gène *eaaA* a été détecté chez 4 souches de l'ECOR-Collection appartenant au groupe phylogénétique A, alors que le gène *aida-I* a été détecté chez une seule souche APEC du groupe phylogénétique A (la souche *E. coli* χ 7122). Finalement le gène *pet* fut seulement détecté chez la souche témoin EAEC O42.

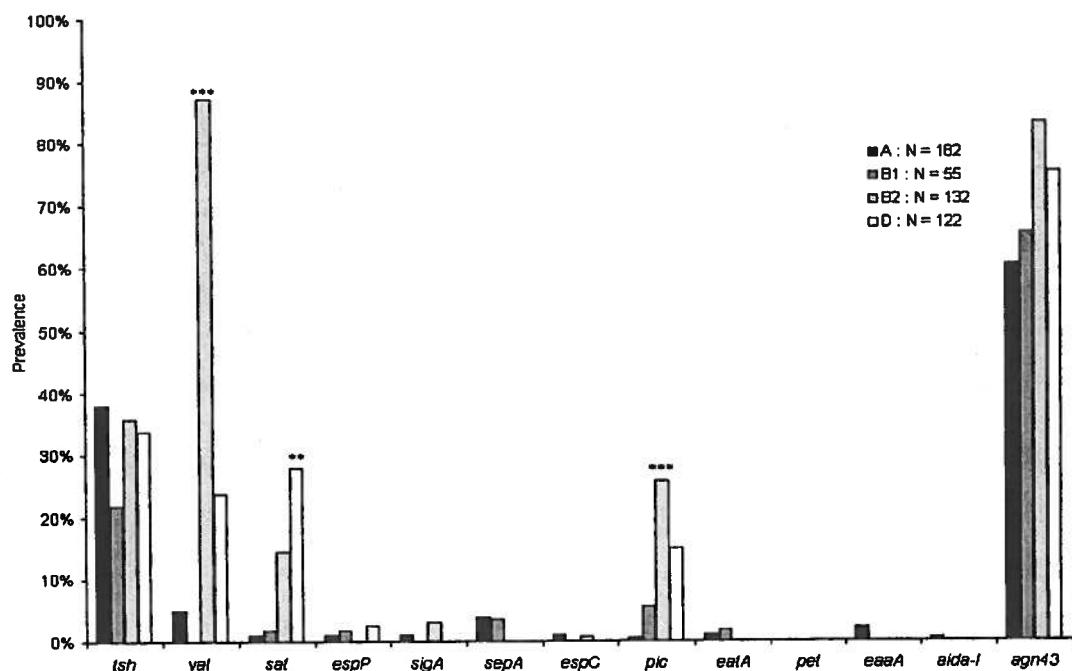


Figure 3.1 : Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 491 souches d'*E. coli*. Les séquences encodant les gènes d'autotransporteurs ont été détectées par PCR multiplexe. La prévalence est présentée comme un pourcentage de la population totale des souches associée avec chaque groupe phylogénétique. *** $P < 0,0005$; ** $P < 0,005$.

Parmi les souches d'*E. coli* commensales (provenant de la collection ECOR), la présence des gènes *vat* et *pic* est fortement associée aux souches du groupe B2 ($P < 0,0001$ et $P < 0,0002$ respectivement). La présence du gène *sat* est associée aux souches du groupe phylogénétique D ($P < 0,02$). Finalement, la présence du gène *agn43* ainsi que son allèle *agn43bCFT073* est associée aux souches provenant du groupe phylogénétique B2 ($P < 0,04$ et $P < 0,005$ respectivement) (figure 3.2).

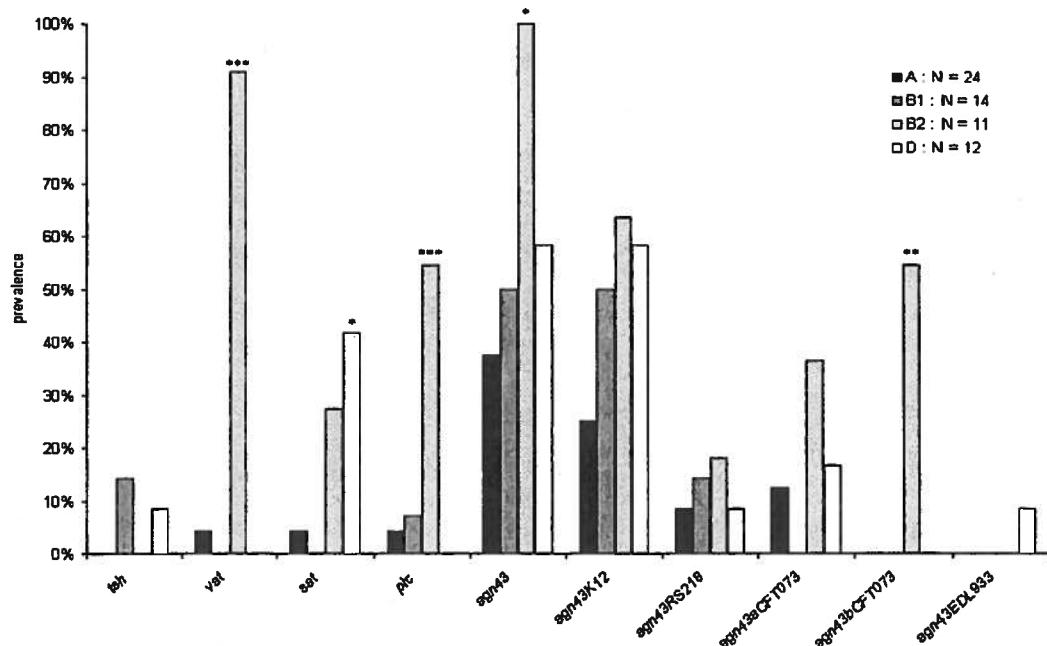


Figure 3.2 : Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 61 souches commensales d'*E. coli* provenant de l'ECOR-Collection. Les séquences encodantes les gènes d'autotransporteurs ont été détectées par PCR multiplexe. La prévalence est présentée comme un pourcentage de la population totale des souches associée avec chaque groupe phylogénétique. *** $P < 0,0005$; ** $P < 0,005$; * $P < 0,05$.

Parmi les souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC), la présence des gènes *vat*, *pic* et des allèles *agn43aCFT073* et *agn43bCFT073* est fortement associée aux souches provenant du groupe phylogénétique B2 ($P < 0,0001$; $P < 0,0004$; $P < 0,0001$ et $P < 0,0001$ respectivement). La présence du gène *sat* et de l'allèle *agn43K12* est associée aux souches du groupe D ($P < 0,02$ et $P < 0,0001$), alors que la présence du gène *tsh* est associé aux souches du groupe A ($P < 0,02$) (figure 3.3).

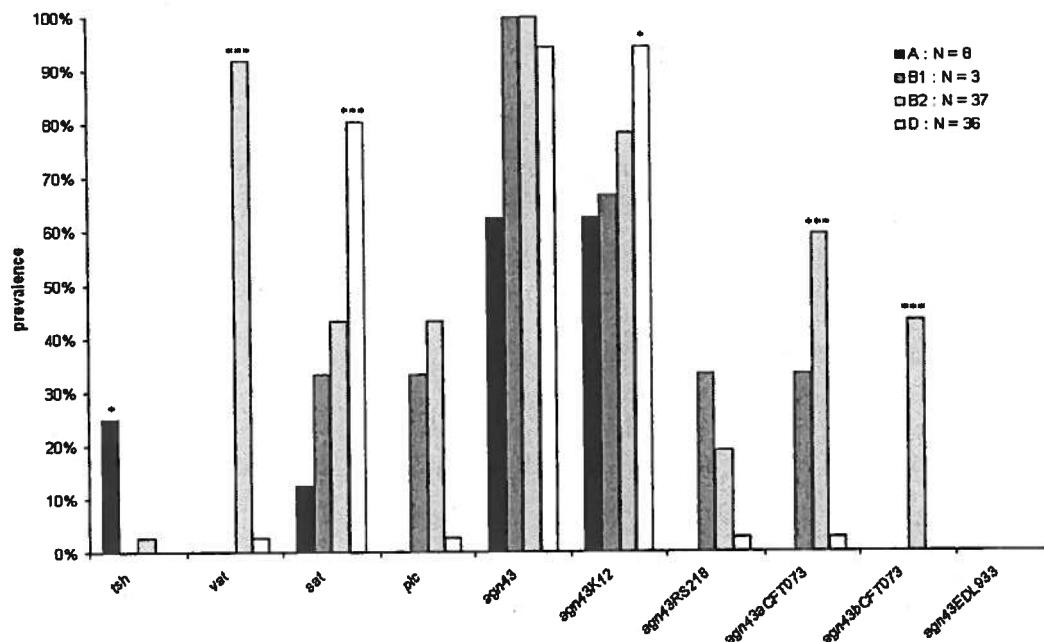


Figure 3.3 : Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 84 souches uropathogènes d'*E. coli* (UPEC). Les séquences encodant les gènes d'autotransporteurs ont été détectées par PCR multiplexe. La prévalence est présentée comme un pourcentage de la population totale des souches associée avec chaque groupe phylogénétique. *** $P < 0,0005$; * $P < 0,05$.

Parmi les souches pathogènes aviaires (APEC), la présence du gène *tsh* est distribué de façon aléatoire. La présence du gène *vat* est forment associée aux souches du groupe phylogénétique B2 ($P < 0,0001$) ainsi qu'aux souches des sérogroupes O1 et O2 ($P < 0,0001$). La présence du gène *pic* est associée aux souches du groupe D ($P < 0,0001$), mais est distribuée de façon aléatoire parmi les différents sérogroupes. La présence du gène *sigA* est associée aux souches du sérogroupe O1 ($P < 0,0008$) et la présence du gène *agn43* et de son allèle K12 est associée avec les souches des sérogroupes O1 et O2 ($P < 0,02$ et $P < 0,03$ respectivement, figures 3.4 et 3.5).

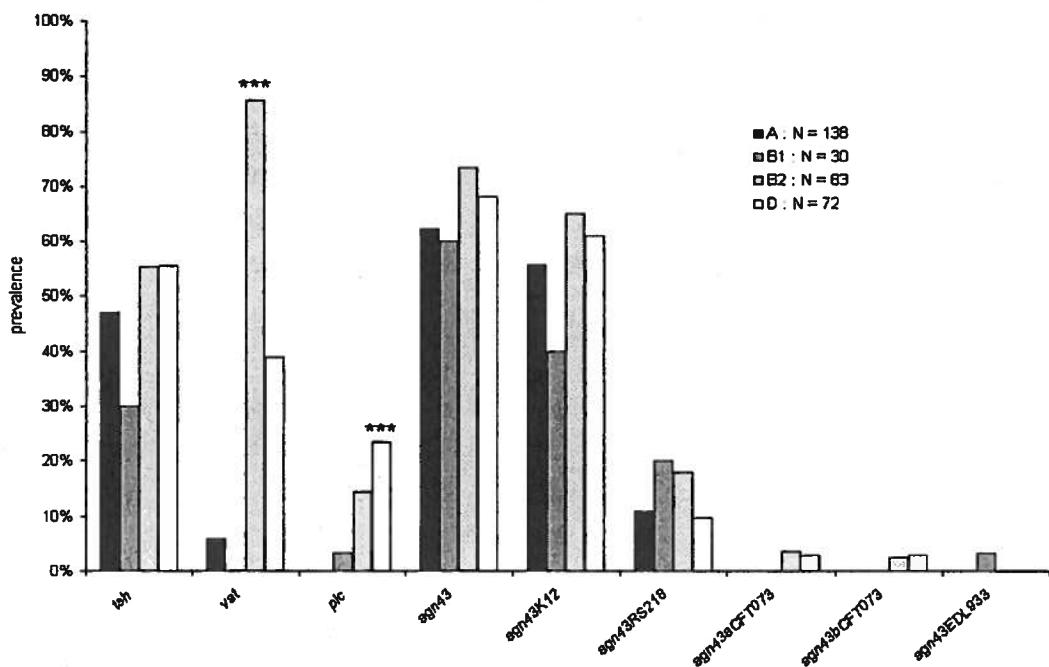


Figure 3.4 : Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 323 souches pathogènes aviaires d'*E. coli* (APEC). Les séquences encodant les gènes d'autotransporteurs ont été détectées par PCR multiplexe. La prévalence est présentée comme un pourcentage de la population totale des souches associée avec chaque groupe phylogénétique. *** $P < 0,0005$.

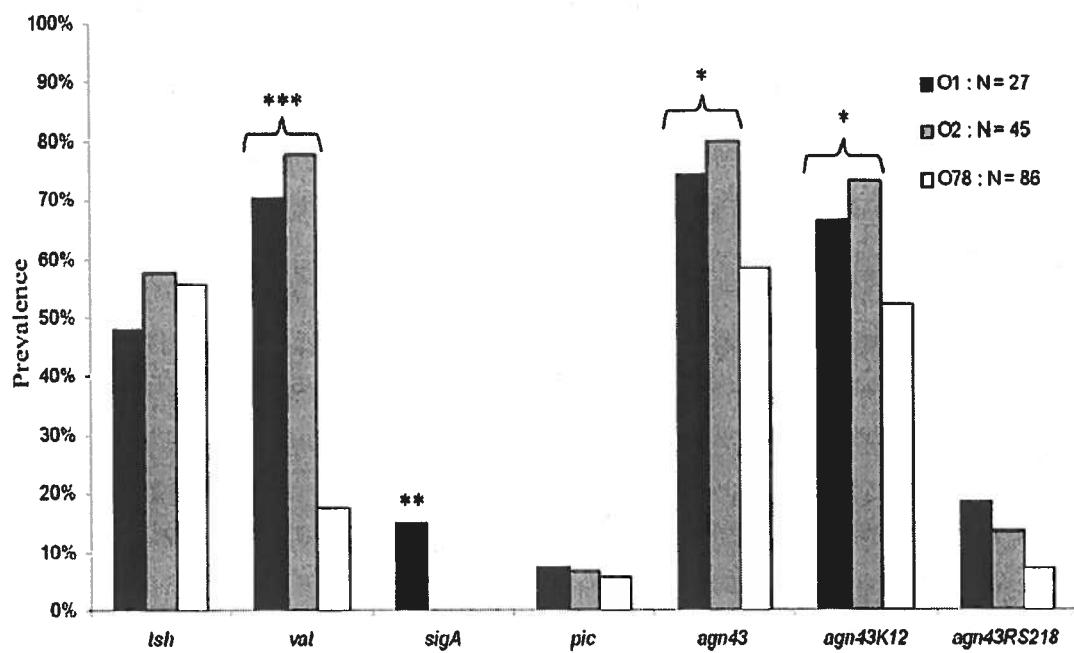


Figure 3.5 : Prévalence des gènes d'autotransporteurs chez 158 souches pathogènes aviaires d'*E. coli* (APEC). Les séquences encodant les gènes d'autotransporteurs ont été détectées par PCR multiplexe. La prévalence est présentée comme un pourcentage de la population totale des souches associée avec chaque sérogroupe. *** $P < 0,0005$; ** $P < 0,005$; * $P < 0,05$.

Selon un test de Kruskal-Wallis, le nombre moyen de SPATEs par souche varie de façon significative parmi les groupes phylogénétiques et pathospécifiques ($P < 0,0001$ et $P < 0,0005$ respectivement, figure 3.6 et 3.7).

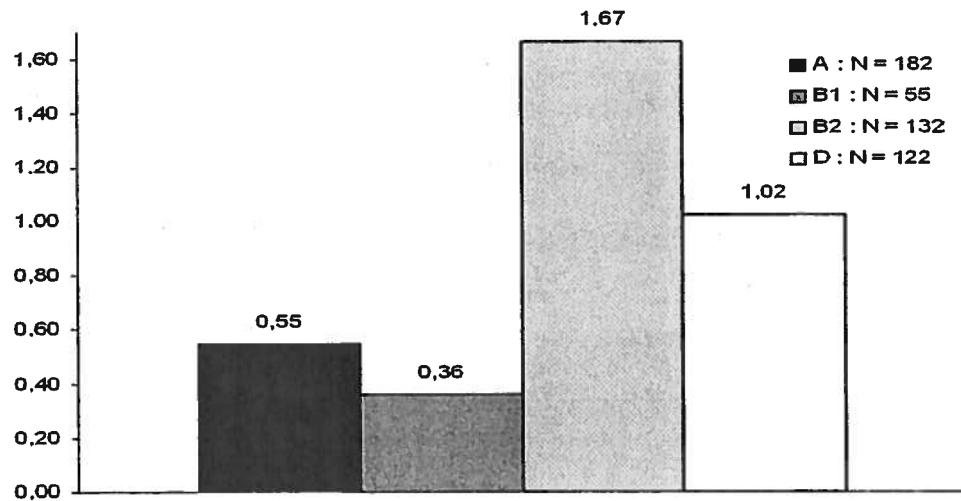


Figure 3.6 : Nombre moyen de gènes de SPATEs détectés par souche selon les différents groupes phylogénétiques, chez 491 souches d'*E. coli* testées. La moyenne est déterminée par le rapport entre le nombre total de gènes d'autotransporteurs détectés et le nombre de souches testées pour chaque groupe phylogénétique.

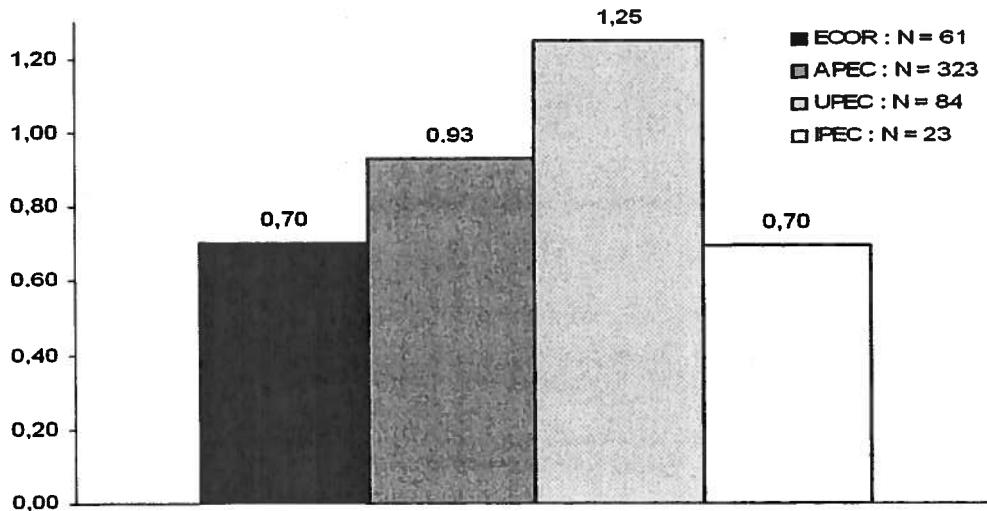


Figure 3.7 : Nombre moyen de gènes de SPATEs détectés par souche selon les différents groupes pathospécifiques, chez 491 souches d'*E. coli* testées. La moyenne est déterminée par le rapport entre le nombre total de gènes d'autotransporteurs détectés et le nombre de souches testées pour chaque groupe pathospécifique.

Les figures suivantes permettent de constater que le nombre de variants d'*agn43* détectés par souche varie selon les groupes phylogénétiques et pathospécifiques (figure 3.8 et 3.9). Selon un test de Kruskal-Wallis, le nombre moyen de variants d'*agn43* par souche étudiée varie de façon significative parmi les groupes phylogénétiques et les groupes pathospécifiques ($P < 0,0001$ dans les deux cas).

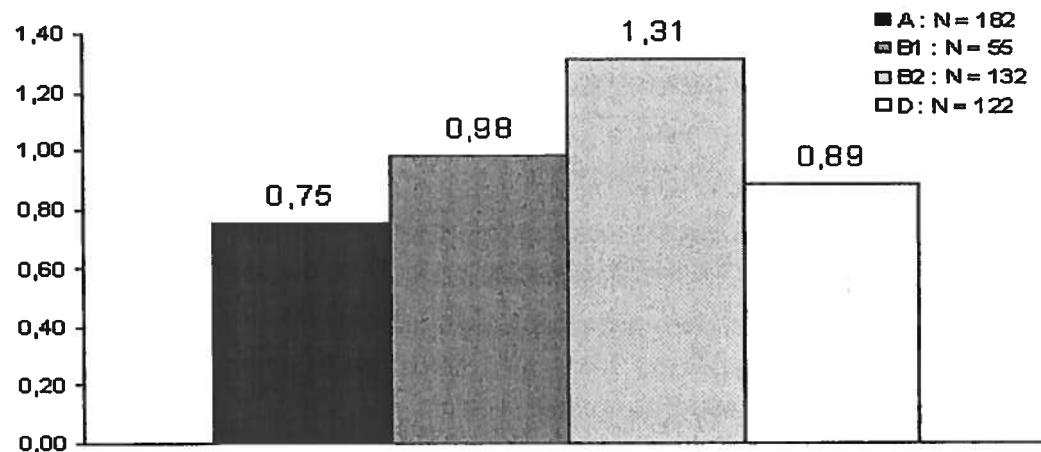


Figure 3.8 : Nombre moyen de variants d'*agn43* détectés par souche selon les différents groupes phylogénétiques, chez 491 souches d'*E. coli* testées. La moyenne est déterminée par le rapport entre le nombre total de variants détectés et le nombre de souches testées pour chaque groupe phylogénétique.

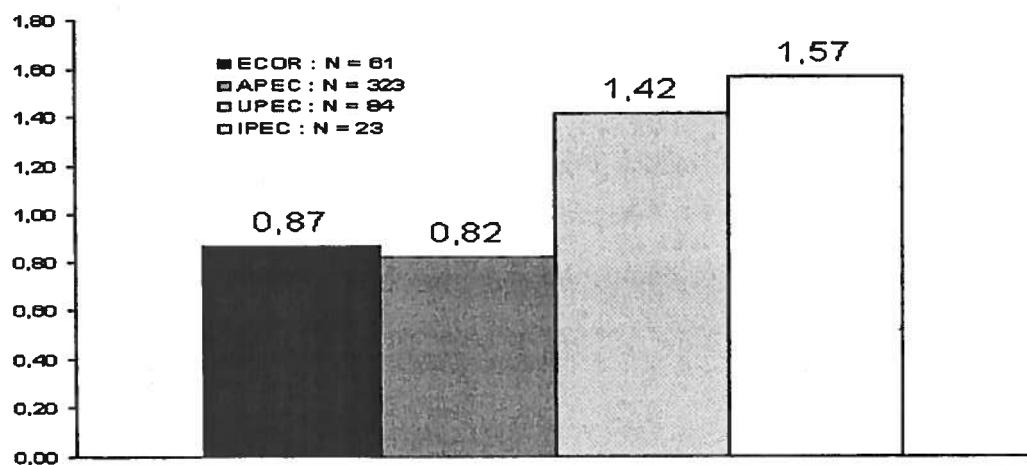


Figure 3.9 : Nombre moyen de variants d'*agn43* détectés par souche selon les différents groupes pathospécifiques, chez 491 souches d'*E. coli* testées. La moyenne est déterminée par le rapport entre le nombre total de variants détectés et le nombre de souches testées pour chaque groupe pathospécifique.

Chapitre 4 : Discussion

Lors de cette étude, nous avons étudié la localisation des gènes *tsh* et *vat*. Nous avons aussi développé et validé une méthode de PCR en multiplexe afin de détecter la présence de différents gènes d'autotransporteurs chez *E. coli*. La prévalence de ces gènes a ensuite été évaluée parmi 491 souches d'*E. coli*, dont 323 souches provenant de pathogénies aviaires (APEC), 73 souches provenant d'infections urinaire humaines (UPEC), 23 souches pathogènes intestinales (IPEC), et les 72 souches de la ECOR-Collection (incluant 61 souches de la flore intestinale commensale et 11 isolats provenant d'infections du tractus urinaire).

Bien que plusieurs s'entendent pour affirmer que les autotransporteurs Tsh et Vat sont deux protéines différentes ayant des phénotypes différents, il règne toujours une certaine confusion à ce sujet (Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000 ; Heimer, Rasko *et al.*, 2004 ; Parham, Pollard *et al.*, 2005b ; Parreira et Gyles, 2003). Des expériences d'hybridation de type Southern sur des extraits génomiques et plasmiques de souches d'*E. coli* testées positives et/ou négative pour la présence des gènes *tsh* et/ou *vat* par PCR nous ont permis de déterminer les localisations génétiques respectives de ces deux gènes. La figure 2.6 démontre bien que la séquence encodant l'autotransporteur Tsh se retrouve sur des grands plasmides alors que la séquence encodant l'autotransporteur Vat est localisée sur le chromosome bactérien. Parmi les souches analysées, il n'a jamais été possible de détecter la présence de *vat* à partir des extraits plasmiques, alors que *tsh* y est facilement retrouvé. Grâce à ces expériences d'hybridation de type Southern, nous avons donc confirmé la présence de *tsh* sur un plasmide et de *vat* sur le chromosome bactérien, et validé les résultats obtenus par la méthode de la PCR.

En plus d'être localisés à des endroits distincts, ces deux gènes présentent des distributions phylogénétiques et pathospécifiques différentes. La séquence encodant l'autotransporteur Tsh est distribué de façon aléatoire parmi les différents groupes phylogénétiques alors que la séquence encodant Vat est toujours fortement associée aux souches provenant du groupe phylogénétique B2. La prévalence de *tsh* est plus élevée chez les souches APEC alors que la prévalence de *vat* est plus élevée chez les UPEC (figures 2.4 et 3.1, tableau 2.2). La séquence encodant *tsh* est en fait très peu retrouvée

ailleurs que chez les souches APEC alors que la séquence encodant *vat* semble moins exclusive aux souches UPEC (figure 2.4, tableau 2.2).

Certaines études considèrent que les souches provoquant des maladies aviaires sont très semblables à celles causant des infections du tractus urinaire humain, et ce, parce qu'elles partagent quelques sérogroupes (notamment O1 et O2) (Rodriguez-Siek, Giddings *et al.*, 2005a ; Ron, 2006). Lorsqu'on observe la distribution des séquences encodant les différents autotransporteurs chez les souches aviaires des sérogroupes O1, O2 et O78, on remarque que les souches appartenant aux sérogroupes O1 et O2 présentent un profil se rapprochant de celui présenté par les souches UPEC (tableau 2.2 et figure 3.5). On dénote toutefois plusieurs différences au niveau de la prévalence de divers gènes d'autotransporteurs entre les UPEC et les APEC (figures 3.3 et 3.4). Un certain nombre de séquences sont très prévalentes chez les souches UPEC comparativement aux souches APEC : notamment les séquences encodant *vat*, *sat*, *pic*, *agn43aCFT073* et *agn43bCFT073* (figure 2.4). Il serait ainsi possible que certaines souches d'*E. coli* causant des infections du tractus urinaire chez les humains soient véhiculée par de la volaille contaminée consommée par les humains, où les bactéries survivraient le long du tractus digestif et iraient infecter les voies urinaires par propagation uro-fécale. Néanmoins, nos résultats suggèrent que les souches d'*E. coli* causant des infections du tractus urinaire humain proviennent de sources diversifiées.

En général, les SPATEs sont plus souvent retrouvés chez les souches d'*E. coli* appartenant aux groupes phylogénétiques B2 et D. En effet, les souches provenant de ces deux groupes possèdent en moyenne un nombre plus élevé de séquences encodant des SPATEs que les souches provenant des groupes A et B1 (figure 3.6). De même, le nombre moyen de gènes de SPATEs par souche semble plus élevé chez les UPEC (faisant en majorité parti des groupes phylogénétiques B2 et D) (figure 3.7). Ces résultats sont corroborés par certaines études stipulant que les souches provoquant des maladies extra-intestinales appartenant aux groupes phylogénétiques B2 et D possèdent plus de facteurs de virulences que les souches provenant des groupes A et B1 (Lecointre, Rachdi *et al.*, 1998 ; Picard, Garcia *et al.*, 1999). Cette tendance est aussi observée dans la ECOR-Collection où c'est majoritairement chez les souches des groupes B2 et D (et un sous-groupe de A) que l'on détecte des séquences codant pour des SPATEs (figures 2.3 et

3.2). Ces résultats concordent pour la plupart avec ceux d'autres expériences semblables menées par Parham *et al.* (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). Cependant, on dénote quelques différences entre nos résultats et les leurs. En effet, en utilisant des amorces dégénérées, ces chercheurs ont détecté la présence de séquences encodant des SPATEs chez 29 souches de la collection ECOR alors qu'avec des amorces spécifiques, nous en avons détecté chez 38 des 72 souches de cette même collection (figure 2.3) (Parham, Pollard *et al.*, 2005b). Ces divergences peuvent être dues à certaines différences de séquence nucléotidique, à la présence de gènes partiels et/ou interrompus, ou encore à la spécificité des amorces utilisées. En effet, en utilisant des amorces dégénérées, Parham et ses collaborateurs ont tenté d'obtenir un plus large spectre de détection au détriment de la spécificité des amorces pour les séquences ciblées. De plus, en comparant deux expériences distinctes menées par ce groupe, on retrouve le même genre de divergences qu'avec nos résultats (Parham, Pollard *et al.*, 2005a ; Parham, Pollard *et al.*, 2005b). Ainsi, l'utilisation d'amorces dégénérées peut être utile pour donner un aperçu général de la situation, cependant l'emploi d'amorces spécifique est beaucoup plus adéquat afin d'obtenir des résultats précis et plus près de la réalité.

La majorité des souches criblées provenaient de maladies extra-intestinales (APEC et UPEC). Il n'est donc pas surprenant de constater que les gènes d'autotransporteurs les plus souvent retrouvés sont ceux ayant été découverts chez des souches ExPEC : *tsh*, *vat* et *sat*. On remarque toutefois que la prévalence du gène *pic* est assez élevée (et comparable à la prévalence de *sat*) alors que ce dernier a été identifié chez une souche entérique. Puisque cette protéine est multifonctionnelle, ceci suggère qu'elle confère un avantage pour la souche bactérienne dans un environnement extra-intestinal. De plus, un homologue du gène *pic*, (*picU*, identique à 96%), a été caractérisé chez la souche *E. coli* uropathogène CFT073 (Henderson, Czeczulin *et al.*, 1999 ; Parham, Srinivasan *et al.*, 2004 ; Rajakumar, Sasakawa *et al.*, 1997). Puisque la méthode employée pour procéder à la détection de cette séquence est incapable de discriminer entre ces deux homologues, il est probable que c'est cet homologue qui fut le plus souvent détecté chez les souches testées. La prévalence de quelques gènes d'autotransporteurs est très peu représentée (sinon quasi absente) parmi les souches criblées : *sigA*, *eatA*, *eaaA*, *pet* ainsi que *aida-I* (figure 3.1). Puisque ces autotransporteurs ont été découverts chez des souches entériques

(voir la section 1.6.4), peut-être que le criblage d'un plus grand nombre de souches IPEC aurait permis d'établir une distribution phylogénétique.

Il existe à ce jour cinq variants connus d'Ag43 (voir la section 1.6.4.1.2). Selon certaines études, il semble de plus assez fréquent que des souches cliniques contiennent des copies multiples de ce gène (Roche, McFadden *et al.*, 2001). Phylogénétiquement, la séquence encodant Ag43 est distribuée de façon aléatoire parmi les souches criblées (tableau 2.2), cependant ce sont les souches appartenant au groupe phylogénétique B2 qui possèdent en moyenne le plus de variants par souche testée, certaines souches détenant même 3 ou 4 variants à elles seules (figure 3.8). De façon pathospécifique, cette même séquence est significativement associée aux souches d'*E. coli* causant des infections du tractus urinaire (figure 2.4). Il est cependant intéressant de constater que malgré l'association de cette séquence aux souches UPEC, ce sont les souches IPEC qui possèdent en moyenne le plus de variants par souche testée (figure 3.9). Les différents variants de cet autotransporteur démontrent une distribution phylogénétique et pathospécifique (figures 2.4, tableau 2.2) : les allèles provenant de la souche UPEC CFT073 sont significativement associés aux souches du groupe phylogénétique B2 et aux souches UPEC, alors que les allèles provenant de la souche MNEC RS218 et de la souche IPEC EDL933 sont significativement associés aux souches du groupe phylogénétique B1 et aux souches IPEC.

La distribution des différents variants d'*agn43* est assez dispersée chez les souches de l'ECOR-Collection, l'allèle provenant de la souche commensale K12 étant la plus commune. C'est cependant chez les souches appartenant au groupe phylogénétique B2 que la prévalence de la séquence encodant Ag43 est la plus élevée (tableau 2.2, figure 3.2). De plus, neuf de ces quinze souches possèdent au moins deux allèles différents. Finalement, bien que cinq variants d'Ag43 soient déjà connus, il semble en exister d'autres. En effet, plusieurs souches criblées (28 des 491 souches testées, soit 5,7%) possèdent la séquence codant Ag43, mais aucun de ses variants spécifiques. Il est aussi probable que certaines souches possèdent des séquences partielles de gène d'autotransporteurs.

Ceci est la première étude concernant la distribution globale d'*agn43* (par la détection de séquences de régions conservées et de séquences de cinq différents variants alléliques).

Aussi, cette étude est la première à démontrer que certains gènes d'autotransporteurs sont associés à des souches d'*E. coli* provenant de la volaille (*tsh*), alors que d'autres y sont rarement détectés (*sat*). Globalement, nos résultats indiquent que les séquences de gènes d'autotransporteurs sont associés phylogénétiquement et/ou de façon pathospécifique aux différentes souches d'*E. coli* étudiées. Ces résultats suggèrent donc que le profil d'autotransporteurs pourrait être utile pour fin d'analyses comparatives d'*E. coli* de sources clinique, alimentaire ou environnementale. La méthode de détection par PCR, conjuguée avec d'autres méthodes d'épidémiologie moléculaire, pourrait être déjà appliquée afin de caractériser et déterminer le risque clinique ou de zoonose potentiel des souches d'*E. coli* de différentes provenances. De plus, plusieurs autotransporteurs (incluant une variété de SPATEs, antigène 43 et AIDA-I) identifiés chez des souches pathogènes d'*E. coli* et associées à des infections entériques ou extraintestinales chez l'humain et autres animaux ont été caractérisés comme facteur de virulence et/ou comme des protéines pouvant faciliter la colonisation ou l'infection par les bactéries Gram négatives (Bellini, Elias *et al.*, 2005 ; Benjelloun-Touimi, Sansonetti *et al.*, 1995 ; Benz et Schmidt, 1992 ; Brunder, Schmidt *et al.*, 1997 ; Danese, Pratt *et al.*, 2000 ; Delicato, de Brito *et al.*, 2002 ; Dozois, Dho-Moulin *et al.*, 2000 ; Eslava, Navarro-Garcia *et al.*, 1998 ; Guyer, Henderson *et al.*, 2000 ; Guyer, Radulovic *et al.*, 2002 ; Heimer, Rasko *et al.*, 2004 ; Henderson, Czeczulin *et al.*, 1999 ; Henderson, Hicks *et al.*, 1999 ; Henderson et Nataro, 2001 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 2004 ; Henderson, Navarro-Garcia *et al.*, 1998 ; Kostakioti et Stathopoulos, 2004 ; Mellies, Navarro-Garcia *et al.*, 2001 ; Navarro-Garcia, Canizalez-Roman *et al.*, 2004 ; Ngeleka, Pritchard *et al.*, 2003 ; Niewerth, Frey *et al.*, 2001 ; Niyogi, Vargas *et al.*, 2004 ; Otto, van Dooren *et al.*, 2002 ; Parham, Srinivasan *et al.*, 2004 ; Patel, Dotson *et al.*, 2004 ; Ruiz, Navia *et al.*, 2002 ; Salvadori, Yano *et al.*, 2001 ; Sandt et Hill, 2000 ; Sherlock, Schembri *et al.*, 2004 ; Stathopoulos, Provence *et al.*, 1999 ; Stehling, Yano *et al.*, 2003 ; Stein, Kenny *et al.*, 1996 ; Taddei, Fasano *et al.*, 2005 ; Taddei, Moreno *et al.*, 2003). Ainsi, certains autotransporteurs pourraient devenir des cibles thérapeutiques intéressantes lors d'infections à *E. coli*.

Chapitre 5 : Conclusion

Au cours de ce projet de maîtrise, nous avons fait la mise au point d'une méthode diagnostique simple et rapide pour la détection des gènes d'autotransporteurs. Cette méthode a permis de constater que certains gènes d'autotransporteurs sont distribués de façon phylogénétique et pathospécifique parmi les souches d'*E. coli* criblées. De plus, la plupart des gènes d'autotransporteurs sont retrouvés chez les souches appartenant aux groupes B2 et D ce qui corrobore l'hypothèse selon laquelle les souches d'*E. coli* provenant de ces groupes détiendraient un plus grand nombre de facteurs de virulence que celles faisant parti des groupes phylogénétiques A et B1. Aussi, puisque certains autotransporteurs sont impliqués le processus d'infection par *E. coli*, ces molécules pourraient servir de cibles thérapeutiques. Finalement, les expériences d'hybridation de type Southern ont permis de déterminer la localisation des gènes *tsh* et *vat*. Le gène *vat* est localisé sur le chromosome alors que le gène *tsh* est localisé sur un plasmide, ce qui expliquerait sa distribution aléatoire parmi les différents groupes phylogénétiques.

ANNEXE 1

Résultats bruts du criblage de 491 souches d'*E. coli* pour la présence de différents gènes d'autotransporteurs.

# QT	Souche Initiale	groupe phylogénétique	LC	sérotype	rst	var	rst	espP	sigA	sepA	espC	pIC	eatA	pet	eaA	aidA-I	agn43	agn43	agn43a	agn43b	agn43	EDL
																	K12	RS218	CFT	CFT		
2P6	B2		O2:K1:H7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FM6	B2		O2:K1:H7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
FM8	B2		O4:K12:H-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	
FM4	B2		O6:K2:H1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	
V5	B2		O6:K2:H1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
V6	B2		O2:K7:H-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
V15	B2		O1:K1:H7	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
V19	B2		O6:K5:H-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
V21	B2		O7:5:K5:H5	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
V22	B2		O6:K5:H-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
V23	B2		O1:K1:H7	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
V24	B2		O2:K7:H-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
H1	B2		O2:K7:H1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
H3	B2		O6:K5:3:H7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
H5	B2		O1:8:ec:K5:H-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
H15	B2		O2:K1:H7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
H16	B2		O1:K1:H7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
H19	B2		O2:K7:H-	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
H25	B2		O2:K1:H7	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
H26	B2		O6:K2:H1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
V31	B2		O4:K12:H1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
536	B2			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
RS218	B2			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
J96	B2			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
CP9	B2			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
CFT073	B2			0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
S1	B2			0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
APEC															stérogroupe					0	0	
QT502	BEN 2444	A		1	0										1					0	0	
QT384	BEN 0075	A		2	0										2					0	0	

# QT	Souche initiale	groupe phylogénétique	LC	sérotype	ish	var	expP	sigA	sepA	expC	pic	expA	pet	expA	aids-1	agn43	agn43a	agn43b	agn43
																K12	RS18	CFT	EDL
QT436	BEN 0160	D	1	O2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
QT584	BEN 2979	D	1	O2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0
QT591	BEN 1715	D	1	O2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT592	BEN 1716	D	1	O2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT593	BEN 1717	D	1	O2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT602	BEN 1756	D	1	O2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
QT603	BEN 2905	D	1	O2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT612	BEN 1967	D	1	O2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT439	BEN 2374	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
QT442	BEN 2381	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT443	BEN 2382	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT444	BEN 2383	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT448	BEN 2387	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QT452	BEN 2392	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QT459	BEN 2400	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QT460	BEN 2401	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QT491	BEN 2433	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT492	BEN 2434	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT493	BEN 2435	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT494	BEN 2436	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QT495	BEN 2437	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT496	BEN 2438	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT498	BEN 2440	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QT499	BEN 2441	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
QT501	BEN 2443	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT506	BEN 2447	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT513	BEN 2455	A	1	O78	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
QT528	BEN 2470	A	1	O78	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT529	BEN 2940	A	1	O78	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT530	BEN 0001	A	1	O78	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
QT533	BEN 2943	A	1	O78	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

# QT	Souche	groupe phlogistique	LC	sérotype	<i>tsk</i>	<i>vat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>catA</i>	<i>pst</i>	<i>cnaA</i>	<i>aidnA</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43b</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL</i>
QT34	EHEC FH303	B1			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
QT35	EHEC FH1299	B1			0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
QT38	EHEC BOO-	B1			0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
H854	EPEC Ca89-	B2			0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
QT30	EPEC 4221				0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
QT36	EHEC STJ348	D			0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1
QT37	EHEC STU919	D			0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1

ANNEXE 2

Compilation des résultats bruts du criblage de 491 différentes souches d'*E. coli* pour 13 différents gènes d'autotransporteurs

ECOR commensales																						
groupes phylogénétiques	N	<i>tsk</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eatA</i>	<i>pet</i>	<i>aaaaA</i>	<i>aids-I</i>	<i>agn43</i>	<i>K12</i>	<i>RS218</i>	<i>agn43</i>	<i>aCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>BCFT073</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL933</i>
A	23	0	1	1	2	2	1	1	1	0	3	0	9	6	2	3	0	0	0	0	0	
B1	14	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7	7	2	0	0	0	0	0	0	
B2	11	0	10	3	0	0	0	0	0	0	0	0	11	7	2	4	6	6	0	0	0	
D	9	0	0	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	2	0	0	0	0	
E	4	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	2	2	1	0	0	0	0	1	
Total	61	3	11	9	2	2	1	1	8	2	0	4	0	34	27	7	9	6	6	1	1	
APEC																						
groupes phylogénétiques	N	<i>tsk</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eatA</i>	<i>pet</i>	<i>aaaaA</i>	<i>aids-I</i>	<i>agn43</i>	<i>K12</i>	<i>RS218</i>	<i>agn43</i>	<i>aCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>BCFT073</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL933</i>
A	138	65	8	0	0	0	0	0	0	0	0	1	86	77	15	0	0	0	0	0	0	
B1	30	9	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	18	12	6	0	0	0	0	0	1	
B2	83	46	71	0	0	4	0	0	0	12	0	0	0	61	54	15	3	2	2	0	0	
D	72	40	28	0	0	0	0	0	0	17	0	0	0	49	44	7	2	2	2	0	0	
Total	323	160	107	0	0	4	0	0	30	0	0	1	214	187	43	5	4	5	4	1	1	
UPEC																						
groupes phylogénétiques	N	<i>tsk</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eatA</i>	<i>pet</i>	<i>aaaaA</i>	<i>aids-I</i>	<i>agn43</i>	<i>K12</i>	<i>RS218</i>	<i>agn43</i>	<i>aCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>BCFT073</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL933</i>
A	8	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	0	0	0	0	
B1	3	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	3	2	1	1	0	0	0	0	
B2	37	1	34	16	0	0	0	0	16	0	0	0	0	37	29	7	22	16	16	0	0	
D	36	0	1	29	1	0	0	0	1	0	0	0	0	34	34	1	1	0	0	0	0	
Total	84	3	35	47	1	0	1	0	18	0	0	0	0	79	70	9	24	16	16	0	0	

IPEC		groupes phylogénétiques																				
	N	<i>tsk</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eatA</i>	<i>pet</i>	<i>enaA</i>	<i>aida-I</i>	<i>agn43</i>	<i>K12</i>	<i>RS218</i>	<i>agn43</i>	<i>aCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>bCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL933</i>
A	12	2	0	0	0	6	1	0	0	0	0	0	10	9	5	0	0	0	0	0	2	
B1	8	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	8	8	4	0	0	1	1	1	3	
B2	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	
D	2	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	2	
Total	23	3	0	0	3	0	7	2	0	1	0	0	21	18	9	0	0	1	1	1	7	

Total		groupes phylogénétiques																				
	N	<i>tsk</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eatA</i>	<i>pet</i>	<i>enaA</i>	<i>aida-I</i>	<i>agn43</i>	<i>K12</i>	<i>RS218</i>	<i>agn43</i>	<i>aCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>bCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL933</i>
A	182	69	9	2	2	2	7	2	1	2	0	4	1	110	97	22	3	0	0	2		
B1	55	12	0	1	1	0	2	0	3	1	0	0	0	36	29	13	1	1	1	4		
B2	132	47	115	19	0	4	0	1	34	0	0	0	0	110	91	24	29	24	24	0	0	
D	122	41	29	34	3	0	0	0	18	0	0	0	0	92	85	9	5	2	2	3	3	
Total	491	169	153	56	6	6	9	3	56	3	0	4	1	348	302	68	38	27	27	9	9	

APEC LC		Classes de létalité																				
	N	<i>tsk</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eatA</i>	<i>pet</i>	<i>enaA</i>	<i>aida-I</i>	<i>agn43</i>	<i>K12</i>	<i>RS218</i>	<i>agn43</i>	<i>aCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>bCF7073</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL933</i>
LC1	219	130	90	0	4	0	0	25	0	0	0	1	152	134	31	3	3	3	0	0	0	
LC2	38	9	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	29	24	6	0	1	1	1	1	1	
LC3	38	3	4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	19	15	6	2	0	0	0	0	0	

	Total	<i>N</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>ealA</i>	<i>pet</i>	<i>eaaA</i>	<i>aida-I</i>	<i>agn43</i>	<i>K12</i>	<i>agn43</i>	<i>RS218</i>	<i>agn43</i>	<i>aCFT073</i>	<i>agn43</i>	<i>bCFT073</i>	<i>agn43</i>	<i>EDL933</i>
Groupes pathospécifiques																							
ECOR commensales	61	3	11	9	2	2	1	1	8	2	0	4	0	34	27	7	9	9	6	6	1	1	
APEC	323	160	107	0	0	4	0	0	30	0	0	0	1	214	187	43	5	5	4	4	4	1	
UPEC	84	3	35	47	1	0	1	0	18	0	0	0	0	79	70	9	24	24	16	16	0	0	
IPEC	23	3	0	0	3	0	7	2	0	1	0	0	0	21	18	9	0	0	1	1	7	7	
Total	491	169	153	56	6	6	9	3	56	3	0	4	1	348	302	68	38	38	27	27	9	9	

ANNEXE 3

Compilation des résultats en pourcentages du criblage de 491 différentes souches d'*E. coli* pour 13 différents gènes d'autotransporteurs

ECOR communales		N	<i>tsk</i>	<i>wat</i>	<i>saf</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eutA</i>	<i>pet</i>	<i>eaaA</i>	<i>aida-I</i>	<i>agn43</i> K12	<i>agn43</i> <i>RS218</i>	<i>agn43</i> <i>aCFI</i>	<i>agn43</i> <i>bCFI</i>	<i>agn43</i> <i>EDL</i>
A	23	0%	49%	4%	9%	9%	4%	4%	4%	4%	0%	17%	0%	39%	26%	9%	13%	0%	0%
B1	14	14%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	50%	50%	14%	0%	0%	0%
B2	11	0%	91%	27%	0%	0%	0%	0%	55%	0%	0%	0%	0%	100%	64%	18%	36%	55%	0%
D	9	0%	0%	56%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	56%	56%	0%	22%	0%	0%
E	4	8%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	25%	0%	0%	0%	50%	50%	25%	0%	0%	25%
Total	61	5%	18%	15%	3%	3%	2%	2%	13%	3%	0%	7%	0%	56%	44%	11%	15%	10%	2%

APEC		N	<i>tsk</i>	<i>wat</i>	<i>saf</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eutA</i>	<i>pet</i>	<i>eaaA</i>	<i>aida-I</i>	<i>agn43</i> K12	<i>agn43</i> <i>RS218</i>	<i>agn43</i> <i>aCFI</i>	<i>agn43</i> <i>bCFI</i>	<i>agn43</i> <i>EDL</i>
A	138	47%	6%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	1%	62%	56%	11%	0%	0%	0%	
B1	30	30%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	0%	0%	0%	60%	40%	20%	0%	0%	3%	
B2	83	55%	86%	0%	0%	5%	0%	0%	14%	0%	0%	0%	73%	65%	18%	4%	2%	0%	
D	72	56%	39%	0%	0%	0%	0%	0%	24%	0%	0%	0%	68%	61%	10%	3%	3%	0%	
Total	323	50%	33%	0%	0%	1%	0%	0%	9%	0%	0%	0%	66%	58%	13%	2%	1%	0%	

UPEC		N	<i>tsk</i>	<i>wat</i>	<i>saf</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>eutA</i>	<i>pet</i>	<i>eaaA</i>	<i>aida-I</i>	<i>agn43</i> K12	<i>agn43</i> <i>RS218</i>	<i>agn43</i> <i>aCFI</i>	<i>agn43</i> <i>bCFI</i>	<i>agn43</i> <i>EDL</i>
A	8	25%	0%	13%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	63%	63%	0%	0%	0%	
B1	3	0%	0%	33%	0%	0%	33%	0%	33%	0%	0%	0%	0%	100%	67%	33%	33%	0%	
B2	37	3%	92%	43%	0%	0%	0%	43%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	78%	19%	59%	43%	
D	36	0%	3%	81%	3%	0%	0%	3%	0%	0%	0%	0%	0%	94%	94%	3%	3%	0%	
Total	84	4%	42%	56%	1%	0%	1%	0%	21%	0%	0%	0%	94%	83%	11%	29%	19%	0%	

IPFC		<i>agn43</i>														<i>agn43</i>			
groupes phylogénétiques		N	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>entA</i>	<i>pet</i>	<i>entAA</i>	<i>aidA-I</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>
															K12	RS218	aCFT	bCFT	EDL
A	12	17%	0%	0%	0%	0%	50%	8%	0%	0%	0%	0%	0%	83%	75%	42%	0%	0%	17%
B1	8	13%	0%	0%	13%	0%	0%	13%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	50%	0%	13%	38%
B2	1	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
D	2	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	100%	0%	0%	0%	0%	100%
Total	23	13%	0%	0%	13%	0%	30%	9%	0%	4%	0%	0%	91%	78%	39%	0%	4%	30%	

Total		<i>agn43</i>														<i>agn43</i>				
groupes phylogénétiques		N	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>entA</i>	<i>pet</i>	<i>entAA</i>	<i>aidA-I</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	
															K12	RS218	aCFT	bCFT	EDL	
A	182	38%	5%	1%	1%	4%	1%	1%	1%	1%	1%	0%	2%	1%	60%	53%	12%	2%	0%	1%
B1	55	22%	0%	2%	0%	4%	0%	5%	2%	0%	0%	0%	0%	65%	53%	24%	2%	2%	7%	
B2	132	36%	87%	14%	0%	3%	0%	1%	26%	0%	0%	0%	0%	83%	69%	18%	22%	18%	0%	
D	122	34%	24%	28%	2%	0%	0%	0%	15%	0%	0%	0%	0%	75%	70%	7%	4%	2%	2%	
Total	491	34%	31%	11%	1%	1%	2%	1%	11%	1%	0%	1%	0%	71%	62%	14%	8%	5%	2%	

APEC LC		<i>agn43</i>														<i>agn43</i>			
Classes de létalité		N	<i>tsh</i>	<i>vat</i>	<i>sat</i>	<i>espP</i>	<i>sigA</i>	<i>sepA</i>	<i>espC</i>	<i>pic</i>	<i>entA</i>	<i>pet</i>	<i>entAA</i>	<i>aidA-I</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>	<i>agn43</i>
															K12	RS218	aCFT	bCFT	EDL
LC1	219	59%	41%	0%	0%	2%	0%	0%	11%	0%	0%	0%	0%	69%	61%	14%	1%	1%	0%
LC2	38	24%	11%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	0%	0%	0%	0%	76%	63%	16%	0%	3%	3%
LC3	38	8%	11%	0%	0%	0%	0%	0%	3%	0%	0%	0%	0%	50%	39%	16%	5%	0%	0%

Total	groupes	pathospécifiques	N	tsh	vat	sat	espP	sigA	sepA	pic	entA	pet	caaA	aiaI	agn43	K12	agn43	R3218	acFT	agn43	bCFT	agn43	EDL
ECOR commensales	61	5%	18%	15%	3%	3%	2%	2%	13%	3%	0%	7%	0%	56%	44%	11%	15%	10%	2%	1%	0%	0%	
APEC	323	50%	33%	0%	0%	1%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	0%	66%	58%	13%	2%	1%	0%	0%	0%	0%	0%
UPEC	84	4%	42%	56%	1%	0%	1%	0%	21%	0%	0%	0%	0%	94%	83%	11%	29%	19%	0%	0%	0%	0%	0%
IPEC	23	13%	0%	0%	13%	0%	30%	9%	0%	4%	0%	0%	0%	91%	78%	39%	0%	0%	4%	0%	4%	30%	0%
Total	491	34%	31%	11%	1%	1%	2%	1%	11%	1%	1%	1%	0%	71%	62%	14%	8%	5%	5%	2%	2%	2%	2%

Références

- Al-Hasani, K., Henderson, I. R., Sakellaris, H., Rajakumar, K., Grant, T., Nataro, J. P., Robins-Browne, R. et Adler, B.** 2000. The *sigA* gene which is borne on the she pathogenicity island of *Shigella flexneri* 2a encodes an exported cytopathic protease involved in intestinal fluid accumulation. Infect Immun **68**(5): 2457-63.
- Anderson, G. G., Dodson, K. W., Hooton, T. M. et Hultgren, S. J.** 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. Trends Microbiol **12**(9): 424-30.
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. et Hultgren, S. J.** 2003. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. Science **301**(5629): 105-7.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. M., Seidman, J. G., Smith, J. A. et Neilands, J. B., (ed.)** (1991). Current protocols in molecular biology. New York, N.Y., Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience.
- Bellini, E. M., Elias, W. P., Gomes, T. A., Tanaka, T. L., Taddei, C. R., Huerta, R., Navarro-Garcia, F. et Martinez, M. B.** 2005. Antibody response against plasmid-encoded toxin (Pet) and the protein involved in intestinal colonization (Pic) in children with diarrhea produced by enteroaggregative *Escherichia coli*. FEMS Immunol Med Microbiol **43**(2): 259-64.
- Benjelloun-Touimi, Z., Sansonetti, P. J. et Parsot, C.** 1995. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*: autonomous secretion and involvement in tissue invasion. Mol Microbiol **17**(1): 123-35.
- Benjelloun-Touimi, Z., Si Tahar, M., Montecucco, C., Sansonetti, P. J. et Parsot, C.** 1998. SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. Microbiology **144** (Pt 7): 1815-22.
- Benz, I. et Schmidt, M. A.** 1989. Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect Immun **57**(5): 1506-11.
- Benz, I. et Schmidt, M. A.** 1992. AIDA-I, the adhesin involved in diffuse adherence of the diarrhoeagenic *Escherichia coli* strain 2787 (O126:H27), is synthesized via a precursor molecule. Mol Microbiol **6**(11): 1539-46.
- Binet, R., Letoffe, S., Ghigo, J. M., Delepelaire, P. et Wandersman, C.** 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. Gene **192**(1): 7-11.

- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Jansen, W. H., Garcia, V., Vazquez, M. L. et Blanco, J.** 1998. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (northwest Spain). Vet Microbiol **61**(3): 229-35.
- Boerlin, P., Travis, R., Gyles, C. L., Reid-Smith, R., Janecko, N., Lim, H., Nicholson, V., McEwen, S. A., Friendship, R. et Archambault, M.** 2005. Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario. Appl Environ Microbiol **71**(11): 6753-61.
- Bonacorsi, S. et Bingen, E.** 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* causing neonatal meningitis. Int J Med Microbiol **295**(6-7): 373-81.
- Brunder, W., Schmidt, H. et Karch, H.** 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. Mol Microbiol **24**(4): 767-78.
- Burns, D. L.** 1999. Biochemistry of type IV secretion. Curr Opin Microbiol **2**(1): 25-9.
- Cao, T. B. et Saier, M. H., Jr.** 2003. The general protein secretory pathway: phylogenetic analyses leading to evolutionary conclusions. Biochim Biophys Acta **1609**(1): 115-25.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugereb, H. et Oswald, E.** 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet Res **36**(3): 289-311.
- Chaudhuri, R. R., Khan, A. M. et Pallen, M. J.** 2004. coliBASE: an online database for *Escherichia coli*, *Shigella* and *Salmonella* comparative genomics. Nucleic Acids Res **32**(Database issue): D296-9.
- Cheng, L. W. et Schneewind, O.** 2000. Type III machines of Gram-negative bacteria: delivering the goods. Trends Microbiol **8**(5): 214-20.
- Christie, P. J. et Vogel, J. P.** 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. Trends Microbiol **8**(8): 354-60.
- Clarke, S. C., Haigh, R. D., Freestone, P. P. et Williams, P. H.** 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. Clin Microbiol Rev **16**(3): 365-78.
- Clermont, O., Bonacorsi, S. et Bingen, E.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. Appl Environ Microbiol **66**(10): 4555-8.
- Cotter, S. E., Surana, N. K. et St Geme, J. W., 3rd.** 2005. Trimeric autotransporters: a distinct subfamily of autotransporter proteins. Trends Microbiol **13**(5): 199-205.

- Danese, P. N., Pratt, L. A., Dove, S. L. et Kolter, R.** 2000. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. Mol Microbiol 37(2): 424-32.
- Delicato, E. R., de Brito, B. G., Konopatzki, A. P., Gaziri, L. C. et Vidotto, M. C.** 2002. Occurrence of the temperature-sensitive hemagglutinin among avian *Escherichia coli*. Avian Dis 46(3): 713-6.
- Desvaux, M., Parham, N. J. et Henderson, I. R.** 2004a. The autotransporter secretion system. Res Microbiol 155(2): 53-60.
- Desvaux, M., Parham, N. J., Scott-Tucker, A. et Henderson, I. R.** 2004b. The general secretory pathway: a general misnomer? Trends Microbiol 12(7): 306-9.
- Dho-Moulin, M. et Fairbrother, J. M.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). Vet Res 30(2-3): 299-316.
- Diderichsen, B.** 1980. *flu*, a metastable gene controlling surface properties of *Escherichia coli*. J Bacteriol 141(2): 858-67.
- Djafari, S., Ebel, F., Deibel, C., Kramer, S., Hudel, M. et Chakraborty, T.** 1997. Characterization of an exported protease from Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. Mol Microbiol 25(4): 771-84.
- Dobrindt, U.** 2005. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. Int J Med Microbiol 295(6-7): 357-71.
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E. Z., Funfstuck, R. et Hacker, J.** 2001. S-Fimbria-encoding determinant sfa(I) is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. Infect Immun 69(7): 4248-56.
- Dozois, C. M. et Curtiss, R., 3rd.** 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. Vet Res 30(2-3): 157-79.
- Dozois, C. M., Daigle, F. et Curtiss, R., 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Proc Natl Acad Sci U S A 100(1): 247-52.
- Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C. et Curtiss, R., 3rd.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. Infect Immun 68(7): 4145-54.
- Driessen, A. J., Fekkes, P. et van der Wolk, J. P.** 1998. The Sec system. Curr Opin Microbiol 1(2): 216-22.

Dutta, P. R., Cappello, R., Navarro-Garcia, F. et Nataro, J. P. 2002. Functional comparison of serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*. Infect Immun **70**(12): 7105-13.

Escobar-Paramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A. B., Bui, H., Le Bouguenec, C. et Denamur, E. 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. Mol Biol Evol **21**(6): 1085-94.

Eslava, C., Navarro-Garcia, F., Czeczulin, J. R., Henderson, I. R., Cravioto, A. et Nataro, J. P. 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun **66**(7): 3155-63.

Fasano, A., Noriega, F. R., Maneval, D. R., Jr., Chanasongram, S., Russell, R., Guandalini, S. et Levine, M. M. 1995. Shigella enterotoxin 1: an enterotoxin of *Shigella flexneri* 2a active in rabbit small intestine in vivo and in vitro. J Clin Invest **95**(6): 2853-61.

Fekkes, P. et Driesssen, A. J. 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. Microbiol Mol Biol Rev **63**(1): 161-73.

Feng, P., Lampel, K. A., Karch, H. et Whittam, T. S. 1998. Genotypic and phenotypic changes in the emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J Infect Dis **177**(6): 1750-3.

Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B. et Sobel, J. D. 2000. Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. Ann Epidemiol **10**(8): 509-15.

Galan, J. E. et Collmer, A. 1999. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells. Science **284**(5418): 1322-8.

Gentschev, I., Dietrich, G. et Goebel, W. 2002. The *E. coli* alpha-hemolysin secretion system and its use in vaccine development. Trends Microbiol **10**(1): 39-45.

Giovanardi, D., Campagnari, E., Ruffoni, L. S., Pesente, P., Ortali, G. et Furlattini, V. 2005. Avian pathogenic *Escherichia coli* transmission from broiler breeders to their progeny in an integrated poultry production chain. Avian Pathol **34**(4): 313-8.

Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P. et Mobley, H. L. 2000. Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. Mol Microbiol **38**(1): 53-66.

Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F. E. et Mobley, H. L. 2002. Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. Infect Immun **70**(8): 4539-46.

- Hahn, H. P. et von Specht, B. U.** 2003. Secretory delivery of recombinant proteins in attenuated *Salmonella* strains: potential and limitations of Type I protein transporters. FEMS Immunol Med Microbiol 37(2-3): 87-98.
- Hasman, H., Chakraborty, T. et Klemm, P.** 1999. Antigen-43-mediated autoaggregation of *Escherichia coli* is blocked by fimbriation. J Bacteriol 181(16): 4834-41.
- Heimer, S. R., Rasko, D. A., Lockatell, C. V., Johnson, D. E. et Mobley, H. L.** 2004. Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. Infect Immun 72(1): 593-7.
- Henderson, I. R., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F. et Nataro, J. P.** 1999. Characterization of *pic*, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect Immun 67(11): 5587-96.
- Henderson, I. R., Hicks, S., Navarro-Garcia, F., Elias, W. P., Philips, A. D. et Nataro, J. P.** 1999. Involvement of the enteroaggregative *Escherichia coli* plasmid-encoded toxin in causing human intestinal damage. Infect Immun 67(10): 5338-44.
- Henderson, I. R. et Nataro, J. P.** 2001. Virulence functions of autotransporter proteins. Infect Immun 69(3): 1231-43.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. et Ala'Aldeen, D.** 2004. Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. Microbiol Mol Biol Rev 68(4): 692-744.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F. et Nataro, J. P.** 1998. The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol 6(9): 370-8.
- Henderson, I. R. et Owen, P.** 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 181(7): 2132-41.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. et Whittam, T. S.** 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. J Bacteriol 172(11): 6175-81.
- Huang, D. B., Okhuysen, P. C., Jiang, Z. D. et DuPont, H. L.** 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emerging enteric pathogen. Am J Gastroenterol 99(2): 383-9.

Jacob-Dubuisson, F., Locht, C. et Antoine, R. 2001. Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. Mol Microbiol **40**(2): 306-13.

Jarvis, K. G., Giron, J. A., Jerse, A. E., McDaniel, T. K., Donnenberg, M. S. et Kaper, J. B. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7996-8000.

Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J., Wang, Y., Shen, Y., Lu, W., Wang, J., Liu, H., Yang, J., Yang, F., Zhang, X., Zhang, J., Yang, G., Wu, H., Qu, D., Dong, J., Sun, L., Xue, Y., Zhao, A., Gao, Y., Zhu, J., Kan, B., Ding, K., Chen, S., Cheng, H., Yao, Z., He, B., Chen, R., Ma, D., Qiang, B., Wen, Y., Hou, Y. et Yu, J. 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. Nucleic Acids Res **30**(20): 4432-41.

Johnson, J. R. et Russo, T. A. 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". J Lab Clin Med **139**(3): 155-62.

Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jr. et Stell, A. L. 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. Infect Immun **68**(5): 3040-7.

Johnson, J. R., Stell, A. L., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M., Nowicki, B., Johnson, C., Maslow, J. N., Kaul, A., Kavle, J. et Prats, G. 2002. Global molecular epidemiology of the O15:K52:H1 extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* clonal group: evidence of distribution beyond Europe. J Clin Microbiol **40**(6): 1913-23.

Johnson, T. J., Sick, K. E., Johnson, S. J. et Nolan, L. K. 2006. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. J Bacteriol **188**(2): 745-58.

Kado, C. I. et Liu, S. T. 1981. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. J Bacteriol **145**(3): 1365-73.

Kaper, J. B., Nataro, J. P. et Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol **2**(2): 123-40.

Kenny, B. et Finlay, B. B. 1995. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. Proc Natl Acad Sci U S A **92**(17): 7991-5.

Kim, K. S. 2001. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. Infect Immun **69**(9): 5217-22.

- Kim, K. S.** 2003. Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. Nat Rev Neurosci **4**(5): 376-85.
- Klemm, P., Hjerrild, L., Gjermansen, M. et Schembri, M. A.** 2004. Structure-function analysis of the self-recognizing Antigen 43 autotransporter protein from *Escherichia coli*. Mol Microbiol **51**(1): 283-96.
- Koronakis, E., Hughes, C., Milisav, I. et Koronakis, V.** 1995. Protein exporter function and in vitro ATPase activity are correlated in ABC-domain mutants of HlyB. Mol Microbiol **16**(1): 87-96.
- Kostakioti, M. et Stathopoulos, C.** 2004. Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Infect Immun **72**(10): 5548-54.
- Laarmann, S. et Schmidt, M. A.** 2003. The *Escherichia coli* AIDA autotransporter adhesin recognizes an integral membrane glycoprotein as receptor. Microbiology **149**(Pt 7): 1871-82.
- Lecointre, G., Rachdi, L., Darlu, P. et Denamur, E.** 1998. *Escherichia coli* molecular phylogeny using the incongruence length difference test. Mol Biol Evol **15**(12): 1685-95.
- Makino, K., Ishii, K., Yasunaga, T., Hattori, M., Yokoyama, K., Yutsudo, C. H., Kubota, Y., Yamaichi, Y., Iida, T., Yamamoto, K., Honda, T., Han, C. G., Ohtsubo, E., Kasamatsu, M., Hayashi, T., Kuhara, S. et Shinagawa, H.** 1998. Complete nucleotide sequences of 93-kb and 3.3-kb plasmids of an enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 derived from Sakai outbreak. DNA Res **5**(1): 1-9.
- Marrs, C. F., Zhang, L. et Foxman, B.** 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiol Lett.
- Maurer, J., Jose, J. et Meyer, T. F.** 1999. Characterization of the essential transport function of the AIDA-I autotransporter and evidence supporting structural predictions. J Bacteriol **181**(22): 7014-20.
- Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss, R., 3rd, Brown, P. K., Arne, P., Bree, A., Desautels, C. et Fairbrother, J. M.** 2003. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. Infect Immun **71**(1): 536-40.
- Mellies, J. L., Navarro-Garcia, F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J. P. et Kaper, J. B.** 2001. *espC* pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. Infect Immun **69**(1): 315-24.

- Nagai, K., Oubridge, C., Kuglstatter, A., Menichelli, E., Isel, C. et Jovine, L.** 2003. Structure, function and evolution of the signal recognition particle. Embo J 22(14): 3479-85.
- Nataro, J. P. et Kaper, J. B.** 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin Microbiol Rev 11(1): 142-201.
- Nataro, J. P., Steiner, T. et Guerrant, R. L.** 1998. Enteropathogenic *Escherichia coli*. Emerg Infect Dis 4(2): 251-61.
- Navarro-Garcia, F., Canizalez-Roman, A., Luna, J., Sears, C. et Nataro, J. P.** 2001. Plasmid-encoded toxin of enteropathogenic *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. Infect Immun 69(2): 1053-60.
- Navarro-Garcia, F., Canizalez-Roman, A., Sui, B. Q., Nataro, J. P. et Azamar, Y.** 2004. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteropathogenic *E. coli*. Infect Immun 72(6): 3609-21.
- Ngeleka, M., Pritchard, J., Appleyard, G., Middleton, D. M. et Fairbrother, J. M.** 2003. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. J Vet Diagn Invest 15(3): 242-52.
- Niederwerth, U., Frey, A., Voss, T., Le Bouguenec, C., Baljer, G., Franke, S. et Schmidt, M. A.** 2001. The AIDA autotransporter system is associated with F18 and stx2e in *Escherichia coli* isolates from pigs diagnosed with edema disease and postweaning diarrhea. Clin Diagn Lab Immunol 8(1): 143-9.
- Niyogi, S. K., Vargas, M. et Vila, J.** 2004. Prevalence of the *sat*, *set* and *sen* genes among diverse serotypes of *Shigella flexneri* strains isolated from patients with acute diarrhoea. Clin Microbiol Infect 10(6): 574-6.
- Noriega, F. R., Liao, F. M., Formal, S. B., Fasano, A. et Levine, M. M.** 1995. Prevalence of *Shigella* enterotoxin 1 among *Shigella* clinical isolates of diverse serotypes. J Infect Dis 172(5): 1408-10.
- Ochman, H. et Selander, R. K.** 1984. Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. J Bacteriol 157(2): 690-3.
- Otto, B. R., van Dooren, S. J., Dozois, C. M., Luirink, J. et Oudega, B.** 2002. *Escherichia coli* hemoglobin protease autotransporter contributes to synergistic abscess formation and heme-dependent growth of *Bacteroides fragilis*. Infect Immun 70(1): 5-10.

- Otto, B. R., van Dooren, S. J., Nuijens, J. H., Luirink, J. et Oudega, B.** 1998. Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* strain EB1. J Exp Med 188(6): 1091-1103.
- Owen, P., Meehan, M., de Loughry-Doherty, H. et Henderson, I.** 1996. Phase-variable outer membrane proteins in *Escherichia coli*. FEMS Immunol Med Microbiol 16(2): 63-76.
- Paetzel, M.** 2005. Department of Molecular Biology and Biochemistry, Simon Fraser University. http://www.sfu.ca/mbb/mbb/faculty/paetzel/Mark_Paetzel_Page.htm.
- Pallen, M. J., Chaudhuri, R. R. et Henderson, I. R.** 2003. Genomic analysis of secretion systems. Curr Opin Microbiol 6(5): 519-27.
- Parham, N. J., Pollard, S. J., Chaudhuri, R. R., Beatson, S. A., Desvaux, M., Russell, M. A., Ruiz, J., Fivian, A., Vila, J. et Henderson, I. R.** 2005a. Prevalence of pathogenicity island IICFT073 genes among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 43(5): 2425-34.
- Parham, N. J., Pollard, S. J., Desvaux, M., Scott-Tucker, A., Liu, C., Fivian, A. et Henderson, I. R.** 2005b. Distribution of the serine protease autotransporters of the *Enterobacteriaceae* among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. J Clin Microbiol 43(8): 4076-82.
- Parham, N. J., Srinivasan, U., Desvaux, M., Foxman, B., Marrs, C. F. et Henderson, I. R.** 2004. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiol Lett 230(1): 73-83.
- Parreira, V. R. et Gyles, C. L.** 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. Infect Immun 71(9): 5087-96.
- Patel, S. K., Dotson, J., Allen, K. P. et Fleckenstein, J. M.** 2004. Identification and molecular characterization of EatA, an autotransporter protein of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infect Immun 72(3): 1786-94.
- Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Burland, V., Mau, B., Glasner, J. D., Rose, D. J., Mayhew, G. F., Evans, P. S., Gregor, J., Kirkpatrick, H. A., Posfai, G., Hackett, J., Klink, S., Boutin, A., Shao, Y., Miller, L., Grotbeck, E. J., Davis, N. W., Lim, A., Dimalanta, E. T., Potamousis, K. D., Apodaca, J., Anantharaman, T. S., Lin, J., Yen, G., Schwartz, D. C., Welch, R. A. et Blattner, F. R.** 2001. Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. Nature 409(6819): 529-33.
- Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahimi, N., Bingen, E., Elion, J. et Denamur, E.** 1999. The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect Immun 67(2): 546-53.

- Plano, G. V., Day, J. B. et Ferracci, F.** 2001. Type III export: new uses for an old pathway. Mol Microbiol **40**(2): 284-93.
- Pohlner, J., Halter, R., Beyreuther, K. et Meyer, T. F.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. Nature **325**(6103): 458-62.
- Provence, D. L. et Curtiss, R., 3rd.** 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. Infect Immun **62**(4): 1369-80.
- Rajakumar, K., Sasakawa, C. et Adler, B.** 1997. Use of a novel approach, termed island probing, identifies the *Shigella flexneri she* pathogenicity island which encodes a homolog of the immunoglobulin A protease-like family of proteins. Infect Immun **65**(11): 4606-14.
- Robins-Browne, R. M. et Hartland, E. L.** 2002. *Escherichia coli* as a cause of diarrhea. J Gastroenterol Hepatol **17**(4): 467-75.
- Robinson, C. et Bolhuis, A.** 2004. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. Biochim Biophys Acta **1694**(1-3): 135-47.
- Roche, A., McFadden, J. et Owen, P.** 2001. Antigen 43, the major phase-variable protein of the *Escherichia coli* outer membrane, can exist as a family of proteins encoded by multiple alleles. Microbiology **147**(Pt 1): 161-9.
- Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K. et Nolan, L. K.** 2005a. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. Microbiology **151**(Pt 6): 2097-110.
- Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J. et Nolan, L. K.** 2005b. Characterizing the APEC pathotype. Vet Res **36**(2): 241-56.
- Roe, A. J., Hoey, D. E. et Gally, D. L.** 2003. Regulation, secretion and activity of type III-secreted proteins of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157. Biochem Soc Trans **31**(Pt 1): 98-103.
- Ron, E. Z.** 2006. Host specificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. Curr Opin Microbiol **9**(1): 28-32.
- Ruiz, J., Navia, M. M., Vila, J. et Gascon, J.** 2002. Prevalence of the *sat* gene among clinical isolates of *Shigella* spp. causing travelers' diarrhea: geographical and specific differences. J Clin Microbiol **40**(4): 1565-6.
- Russel, M.** 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems. J Mol Biol **279**(3): 485-99.

- Russo, T. A. et Johnson, J. R.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis* **181**(5): 1753-4.
- Russo, T. A. et Johnson, J. R.** 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* **5**(5): 449-56.
- Salvadori, M. R., Yano, T., Carvalho, H. E., Parreira, V. R. et Gyles, C. L.** 2001. Vacuolating cytotoxin produced by avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* **45**(1): 43-51.
- Sandkvist, M.** 2001a. Biology of type II secretion. *Mol Microbiol* **40**(2): 271-83.
- Sandkvist, M.** 2001b. Type II secretion and pathogenesis. *Infect Immun* **69**(6): 3523-35.
- Sandt, C. H. et Hill, C. W.** 2000. Four different genes responsible for nonimmune immunoglobulin-binding activities within a single strain of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**(4): 2205-14.
- Schembri, M. A., Hjerrild, L., Gjermansen, M. et Klemm, P.** 2003. Differential expression of the *Escherichia coli* autoaggregation factor antigen 43. *J Bacteriol* **185**(7): 2236-42.
- Schneider, G., Dobrindt, U., Bruggemann, H., Nagy, G., Janke, B., Blum-Oehler, G., Buchrieser, C., Gottschalk, G., Emody, L. et Hacker, J.** 2004. The pathogenicity island-associated K15 capsule determinant exhibits a novel genetic structure and correlates with virulence in uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **72**(10): 5993-6001.
- Schroder, G. et Lanka, E.** 2005. The mating pair formation system of conjugative plasmids-A versatile secretion machinery for transfer of proteins and DNA. *Plasmid* **54**(1): 1-25.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. et Whittam, T. S.** 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**(5): 873-84.
- Sherlock, O., Dobrindt, U., Jensen, J. B., Vejborg, R. M. et Klemm, P.** 2006. Glycosylation of the self-recognizing *Escherichia coli* Ag43 autotransporter protein. *J Bacteriol* **188**(5): 1798-1807.
- Sherlock, O., Schembri, M. A., Reisner, A. et Klemm, P.** 2004. Novel roles for the AIDA adhesin from diarrheagenic *Escherichia coli*: cell aggregation and biofilm formation. *J Bacteriol* **186**(23): 8058-65.

Stathopoulos, C., Provence, D. L. et Curtiss, R., 3rd. 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. Infect Immun **67**(2): 772-81.

Stehling, E. G., Yano, T., Brocchi, M. et da Silveira, W. D. 2003. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). Vet Microbiol **95**(1-2): 111-20.

Stein, M., Kenny, B., Stein, M. A. et Finlay, B. B. 1996. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. J Bacteriol **178**(22): 6546-54.

Taddei, C. R., Fasano, A., Ferreira, A. J., Trabulsi, L. R. et Martinez, M. B. 2005. Secreted autotransporter toxin produced by a diffusely adhering *Escherichia coli* strain causes intestinal damage in animal model assays. FEMS Microbiol Lett **250**(2): 263-9.

Taddei, C. R., Moreno, A. C., Fernandes Filho, A., Montemor, L. P. et Martinez, M. B. 2003. Prevalence of secreted autotransporter toxin gene among diffusely adhering *Escherichia coli* isolated from stools of children. FEMS Microbiol Lett **227**(2): 249-53.

Torres, A. G., Perna, N. T., Burland, V., Ruknudin, A., Blattner, F. R. et Kaper, J. B. 2002. Characterization of Cah, a calcium-binding and heat-extractable autotransporter protein of enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. Mol Microbiol **45**(4): 951-66.

Vila, J., Vargas, M., Henderson, I. R., Gascon, J. et Nataro, J. P. 2000. Enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in traveler's diarrhea strains. J Infect Dis **182**(6): 1780-3.

Waldron, D. E., Owen, P. et Dorman, C. J. 2002. Competitive interaction of the OxyR DNA-binding protein and the Dam methylase at the antigen 43 gene regulatory region in *Escherichia coli*. Mol Microbiol **44**(2): 509-20.

Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., 3rd, Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Donnenberg, M. S. et Blattner, F. R. 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **99**(26): 17020-4.

Whittam, T. S., Ochman, H. et Selander, R. K. 1983. Multilocus genetic structure in natural populations of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A **80**(6): 1751-5.

- Wild, K., Rosendal, K. R. et Sinning, I.** 2004. A structural step into the SRP cycle. Mol Microbiol **53**(2): 357-63.
- Xie, Y., Kim, K. J. et Kim, K. S.** 2004. Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. FEMS Immunol Med Microbiol **42**(3): 271-9.
- Yen, M. R., Peabody, C. R., Partovi, S. M., Zhai, Y., Tseng, Y. H. et Saier, M. H.** 2002. Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. Biochim Biophys Acta **1562**(1-2): 6-31.
- Yen, M. R., Tseng, Y. H., Nguyen, E. H., Wu, L. F. et Saier, M. H., Jr.** 2002. Sequence and phylogenetic analyses of the twin-arginine targeting (Tat) protein export system. Arch Microbiol **177**(6): 441-50.
- Yeo, H. J. et Waksman, G.** 2004. Unveiling molecular scaffolds of the type IV secretion system. J Bacteriol **186**(7): 1919-26.

