

**INRS-Institut Armand-Frappier**

**Caractérisation des rôles des régulateurs de l'homéostasie du fer chez une souche uropathogène d'*Escherichia coli* causant des infections extra-intestinales**

Par  
Rima Habib

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

Jury d'évaluation

Président du jury  
et examinateur interne

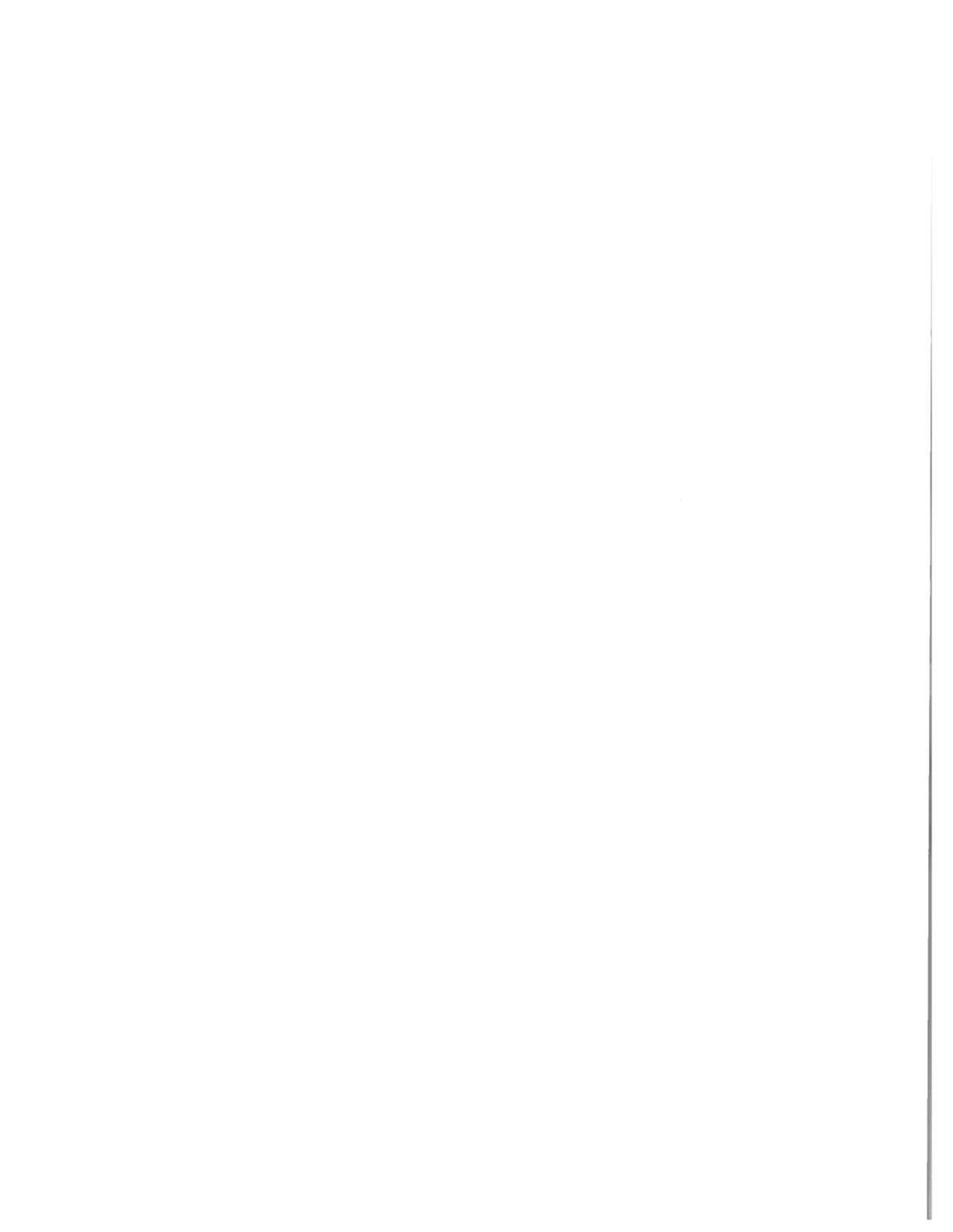
Jonathan Perreault, INRS-IAF

Examineur externe

Mario Jacques  
Faculté de médecine vétérinaire  
Université de Montréal

Directeur de recherche

Charles M. Dozois, INRS-Institut Armand-Frappier



## Résumé

Les bactéries du genre *Escherichia coli* (*E. coli*) causant des infections extra-intestinales (ExPEC) sont la principale cause d'infection du tractus urinaire chez les humains et certains animaux. Ces souches pathogènes possèdent plusieurs facteurs de virulence qui leur permettent de contrer les mécanismes de défense de l'hôte ainsi que les barrières physiques du système urinaire. Parmi ces facteurs, il y a des systèmes particuliers d'acquisition du fer et de résistance au stress oxydatif. La régulation de l'homéostasie du fer est donc importante pour *E. coli* et elle implique deux régulateurs principaux: Fur, un répresseur transcriptionnel, et RyhB, un petit ARN (acide ribonucléique) non codant.

Les objectifs de ce projet consistaient à caractériser les rôles individuels et combinés de Fur et RyhB dans la virulence d'une souche ExPEC uropathogène : la souche CFT073. Celle-ci a été originellement isolée d'un cas de pyélonéphrite aiguë. Les rôles des régulateurs ont donc été plus précisément étudiés au niveau de deux facteurs importants pour la virulence : la production de sidérophores, un système d'acquisition ferrique bactérien efficace, et la capacité à survivre en présence d'un stress oxydatif.

Dans un premier temps, des mutations simples et doubles au niveau des gènes *ryhB* et *fur* ont été effectuées chez la souche uropathogène CFT073. Les mutants ont été testés pour leur capacité à croître dans différents milieux de culture dont un milieu riche, un milieu pauvre en fer, ainsi que l'urine humaine. De plus, les souches mutantes ont été testées pour leur capacité à produire, dans un milieu minimal, les trois principaux types de sidérophores : l'entérobactine, les salmochélines et l'aérobactine. Elles ont aussi été testées pour leur capacité de survie au stress oxydatif impliquant l'agent réactif qu'est le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Afin d'étudier l'importance des régulateurs de fer pour la virulence bactérienne, les différents mutants ont finalement été testés pour leur pathogénicité dans un modèle d'infection de tractus urinaire murin.

Les résultats démontrent que la perte de *fur*, chez le simple ou le double mutant déclenche un retard de croissance dans un milieu minimal pauvre en fer. De plus, la perte simultanée des régulateurs Fur et RyhB (double mutant) diminue significativement la capacité de la souche à produire les trois types de sidérophores ainsi qu'à survivre en présence d'un stress oxydatif associé au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ces données suggèrent donc qu'il existe un important rôle cumulatif des régulateurs de fer chez la souche uropathogène au niveau de la virulence. En effet, dans le modèle de co-infection, qui consistait à étudier la capacité des mutants à être en compétition avec la souche sauvage CFT073, toutes les souches mutantes présentaient une atténuation (un décompte bactérien significativement plus petit que la souche sauvage) dans les reins des souris, 48 heures post-infection. De plus, le double mutant était aussi atténué dans la vessie au sein du même modèle. Étant donné les résultats significatifs que présentait la souche double mutante seule, celle-ci a été testée pour sa seule capacité à causer une infection dans le modèle du tractus urinaire murin. Les résultats après 48 heures post-infection démontrent ainsi que l'absence cumulative de Fur et RyhB a un impact important sur la virulence en raison du fait que la souche double mutante était atténuée dans la vessie des souris. Parallèlement, la même souche doublement complétementée a également été testée et elle était en mesure de regagner la capacité à causer une infection de façon comparable à la souche virulente sauvage. Ceci a ainsi permis d'attribuer de manière définitive les effets observés aux mutations *ryhB* et *fur*.

Somme toute, cette étude est la première à avoir démontré des effets relationnels existants entre les régulateurs de l'homéostasie du fer, Fur et RyhB, sur la production de sidérophores, sur la sensibilité au stress oxydatif ainsi que sur la pathogénèse dans un modèle d'infection du tractus urinaire murin, chez la souche ExPEC CFT073.

  
Rima Habib  
Étudiante

  
Charles M. Dozois  
Directeur de recherche

*À mes parents*

## Remerciements

Un premier grand merci à mon directeur, Charles M. Dozois, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire de recherche. Grâce à son champ de savoir très élargi et à ses méthodes d'enseignement stimulantes, j'ai eu l'occasion d'approfondir mes connaissances scientifiques. Il m'a aussi donné une belle opportunité de travailler sur un projet de maîtrise qui m'a permis d'acquérir diverses expertises en laboratoire dans le domaine de la pathogenèse bactérienne.

Je tiens aussi à remercier fortement l'agent de recherche, Sébastien Houle, qui a été mon formateur de stage préliminaire et qui a soigneusement poursuivi à mes côtés la continuité de ce projet. Ses habiletés et son charisme ont contribué à la réussite du projet ainsi qu'à semer une belle ambiance qui régnait dans notre travail d'équipe. Un merci spécial à tous les membres passés et présents, étudiants et stagiaires, du laboratoire pour leur aide et leur support.

Un énorme merci au professeur François Lépine pour l'utilisation de l'appareil de spectrométrie de masse, à Mélissa Caza pour la génération des résultats de production de sidérophores, ainsi qu'au professeur Éric Massé pour avoir fourni les souches mutées *E. coli* K-12 qui ont été nécessaires à l'étude.

Je tiens à remercier la Fondation Armand-Frappier pour le soutien financier qui m'a été accordé au cours de ma maîtrise.

Je remercie chaleureusement mes amis qui m'ont encouragée et qui m'ont soutenue durant ces années d'études. Merci à ma famille, mes frères et ma sœur, et à mes proches pour m'avoir donnée leur support et pour avoir été présents pour moi autant dans les moments joyeux que difficiles.

Finalement, merci à mes parents pour leurs conseils et leur amour. Je vous aime; vous êtes, et serez toujours, ma source.

## Liste des figures

<b>Figure 1.1 :</b>	Infection ascendante du tractus urinaire.....	11
<b>Figure 1.2 :</b>	Modèle d'une interaction entre le système de défense innée de l'hôte et les UPEC dans la vessie .....	13
<b>Figure 1.3 :</b>	Divers exemples de facteurs de virulence présents chez les ExPEC et contribuant au processus infectieux .....	14
<b>Figure 1.4 :</b>	Biosynthèse de l'entérobactine.....	24
<b>Figure 1.5 :</b>	Mécanisme d'exportation de l'entérobactine et d'importation du complexe ferri-entérobactine chez <i>E. coli</i> .....	25
<b>Figure 1.6 :</b>	Structure du sidéocalin liant l'entérobactine.....	27
<b>Figure 1.7 :</b>	Mécanisme d'exportation des salmochélines et d'importation du complexe ferri-salmochéline chez <i>E. coli</i> .....	29
<b>Figure 1.8 :</b>	Incapacité du lipocalin (sidéocalin) à lier les salmochélines .....	31
<b>Figure 1.9 :</b>	Biosynthèse de l'aérobactine.....	32
<b>Figure 1.10 :</b>	Le régulon SoxRS .....	41
<b>Figure 1.11 :</b>	Mécanisme de régulation négative de la protéine Fur chez diverses bactéries Gram négatives.....	44
<b>Figure 1.12 :</b>	Organisation chromosomique des sidérophores chez <i>E. coli</i> .....	46
<b>Figure 1.13 :</b>	Mécanisme de régulation par RyhB en relation avec Fur chez <i>E. coli</i> K-12.....	52
<b>Figure 1.14 :</b>	Régulation par Fur et RyhB de l'acquisition et de l'entreposage de fer nouvellement acquis chez <i>E. coli</i> K-12.....	53
<b>Figure 1.15 :</b>	Modèle de dégradation partielle de l'opéron <i>iscRSUA</i> par RyhB chez les entérobactéries .....	56
<b>Figure 2.1 :</b>	Plasmides de complémentation .....	68
<b>Figure 2.2 :</b>	Plasmide pIJ258 codant pour le système de transposases TnsABCD.....	70
<b>Figure 2.3 :</b>	Schéma démontrant la génération des souches mutantes complémentées avec le gène <i>ryhB</i> ou <i>fur</i> au site <i>attTn7</i> chromosomique .....	71

<b>Figure 3.1</b>	Colonisation de la vessie (A) et des reins (B) de souris CBA/J coinfectées avec la souche virulente CFT073 $\Delta$ <i>lacZYA</i> (QT1081) et les mutants CFT073 dérivés.....	79
<b>Figure 3.2</b>	Colonisation de la vessie (A) et des reins (B) de souris CBA/J infectées avec la souche virulente CFT073, le mutant CFT073 $\Delta$ <i>ryhB</i> $\Delta$ <i>fur</i> (QT2240) ou la souche complémentée CFT073 $\Delta$ <i>ryhB</i> $\Delta$ <i>fur</i> ; <i>attTn7</i> :: <i>fur</i> , <i>lac</i> :: <i>ryhB</i> (QT2808).....	80
<b>Figure 3.3</b>	Courbes de croissance de la souche sauvage CFT073, des différents mutants dérivés et des souches complémentées, obtenues dans le milieu riche LB.....	82
<b>Figure 3.4</b>	Courbes de croissance de la souche sauvage CFT073, des différents mutants dérivés et des souches complémentées, obtenues dans le milieu minimal M63-glycérol .....	83
<b>Figure 3.5</b>	Courbes de croissance de la souche sauvage CFT073, des différents mutants dérivés et des souches complémentées, obtenues dans l'urine humaine.....	83
<b>Figure 3.6</b>	Pourcentage de survie bactérienne, suite à 30 minutes d'exposition au H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (5mM), de la souche sauvage CFT073, des mutants dérivés et des souches complémentées, dans le milieu riche LB (A) et le milieu minimal M63-glycérol (B).....	85
<b>Figure 3.7</b>	Quantification ( $\mu$ M) des molécules d'entérobactine (A) et de salmochélines (B) et quantification absolue selon l'aire sous la courbe de l'aérobactine (C), de la souche sauvage CFT073 et des différents mutants dérivés .....	88

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.1</b> : Facteurs associés à la virulence <i>in vivo</i> chez les sous-groupes d'ExPEC .....	15
<b>Tableau 1.2</b> : Régulons activés par le système OxyR-H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> chez <i>Escherichia coli</i> ....	42
<b>Tableau 2.1</b> : Souches d' <i>Escherichia coli</i> utilisées pour l'étude.....	60
<b>Tableau 2.2</b> : Amorces utilisées pour l'étude .....	62
<b>Tableau 2.3</b> : Plasmides utilisés pour l'étude .....	65

## Liste des abréviations

µg	: Microgramme
µl	: Microlitre
µm	: Micromètre
µM	: Micromolaire
ABC	: Cassette de liaison à l'ATP
AcCoA	: Acétyl-Coenzyme A
ADN	: Acide désoxyribonucléique
Amp	: Ampicilline
APEC	: « Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> pathogènes aviaires)
ARN	: Acide ribonucléique
ARNm	: Acide ribonucléique messenger
ARNnc	: Petit acide ribonucléique non-codant
ASKA	: « A complete set of <i>Escherichia coli</i> K-12 ORF Archive » (Archive des souches <i>Escherichia coli</i> K-12)
ATP	: Adenosine triphosphate
Cat	: Chloramphénicol
CFU	: « Colony-forming unit » (unité formative de colonie)
Co <sup>2+</sup>	: Ion cobalt
DAEC	: « Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> d'adhérence diffuse)
DAP	: diaminopimélique

DHBS	: 2,3-dihydroxybenzoyl sérine
D. O.	: Densité optique
<i>E. coli</i>	: <i>Escherichia coli</i>
EAEC	: « Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> entéroagréгатives)
ECOR	: « <i>Escherichia coli</i> Reference Collection » (collection de référence d' <i>Escherichia coli</i> )
EHEC	: « Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> entérohémmorragiques)
EIEC	: « Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> entéroinvasives)
EPEC	: « Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> entéropathogènes)
ETEC	: « Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> entérotoxigéniques)
ExPEC	: « Extra-intestinal pathogens <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> pathogènes extra-intestinaux)
Fe <sup>2+</sup>	: Fer ferreux
Fe <sup>3+</sup>	: Fer ferrique
Fe-S	: Groupement Fer-soufre
FRT	: « FLP (flipase) recognition target » (Cible de la flipase FLP)
Fur	: « Ferric uptake regulator » (Régulateur de l'acquisition du fer)
Gen	: Gentamicine
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	: Peroxyde d'hydrogène

IPEC	: « Intestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> pathogènes intestinaux)
IPTG	: Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
ISC	: « Iron-sulphur cluster »
ITUs	: Infections du tractus urinaire
K-12	: Souches d' <i>Escherichia coli</i> non-pathogènes
Kan	: Kanamycine
kDa	: KiloDalton
KmR	: Résistance à la kanamycine
kV	: KiloVolt
LB	: Milieu Luria-Bertani
LC-MS/MS	: « Liquid chromatography-tandem mass spectrometry » (Chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem)
LPS	: Lipopolysaccharides
M63-g.	: Milieu minimal, pauvre en fer, M63-glycérol
M	: Molaire
Mn <sup>2+</sup>	: Ion manganèse
Mb	: Mégabase
ml	: Millilitre
MLEE	: « Multilocus enzyme electrophoresis »
mM	: Millimolaire
MPO	: Myéloperoxydases

<i>N. meningitidis</i>	: <i>Neisseria meningitidis</i>
NADH	: « Nicotinamide adenine dinucleotide »
NGAL	: « Neutrophile-gelatinase-associated lipocalin » (lipocalin associé à la gélatinase des neutrophiles)
ng	: Nanogramme
nm	: Nanomètre
NMEC	: « <i>Escherichia coli</i> neonatal meningite » ( <i>Escherichia coli</i> causant la méningite et septicémie néonatale)
O <sub>2</sub>	: Dioxygène
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	: Anion superoxyde
OH·	: Radical hydroxyle
ORF	: « Open reading frame » (cadre ouvert de lecture)
<i>P. aeruginosa</i>	: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAIs	: « Pathogenicity islands » (îlots de pathogénicité)
pb	: Paire de bases
PBS	: Tampon phosphate saline
PCR	: « Polymerase chain reaction » (réaction de polymérisation en chaîne)
Rep	: Origine de répllication
ROS	: « Reactive oxygen species » (espèces réactives de l'oxygène)
<i>S. aureus</i>	: <i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. enterica</i>	: <i>Samonella enterica</i>

<i>S. typhimurium</i>	: <i>Salmonella typhimurium</i>
SOD	: Superoxide dismutase
SUF	: « Sulfur utilization factor »
TCA	: « Tricyclic citric acid » (Acide citrique tricyclique)
Tet	: Tétracycline
UPEC	: « Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> » ( <i>Escherichia coli</i> uropathogènes)
UVA	: Rayon ultraviolet de type A
<i>V. cholerae</i>	: <i>Vibrio cholerae</i>
wt	: « Wild-type strain » (Souche sauvage)
Xgal	: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside
x g	: Force de centrifugation relative (RCF) $(1,12r \text{ (RPM/1000)})^2$ , où r = rayon en millimètre et RPM = révolution par minute



1.6.4.2.1	<i>Le système des salmochélines et ses composantes</i> .....	28
1.6.4.2.2	<i>Le rôle des salmochélines dans la virulence bactérienne</i> .....	30
1.6.4.3	L'aérobactine.....	31
1.6.4.3.1	<i>Le système de l'aérobactine et ses composantes</i> .....	32
1.6.4.3.2	<i>Le rôle de l'aérobactine dans la virulence bactérienne</i> .....	33
1.6.4.4	Yersiniabactine.....	34
1.6.5	L'entreposage du fer chez les bactéries.....	35
1.6.5.1	Ferritine (FtnA) .....	35
1.6.5.2	Bactéioferritine (Bfr) .....	36
1.6.5.3	Dps .....	36
1.7	Le stress oxydatif et le Fer .....	37
1.7.1	Mécanismes de résistance bactérienne contre les ROS.....	37
1.7.1.1	Élimination de l'ion superoxyde (O <sub>2</sub> <sup>-</sup> ) .....	39
1.7.1.2	Élimination du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).....	39
1.7.2	Systèmes de régulation au stress oxydatif.....	40
1.7.2.1	SoxRS .....	40
1.7.2.1	OxyR .....	41
1.8	Régulateurs de l'homéostasie du fer .....	43
1.8.1	La protéine Fur .....	43
1.8.1.1	Mécanisme de régulation.....	44
1.8.1.2	Fur et l'acquisition du fer .....	45
1.8.1.3	Fur et le stress oxydatif (fer) .....	47
1.8.1.4	Rôles de Fur dans la virulence bactérienne .....	49
1.8.2	RyhB, un petit ARN non-codant .....	50
1.8.2.1	Mécanisme de régulation.....	51
1.8.2.2	RyhB et l'acquisition de fer.....	53
1.8.2.3	RyhB et le stress oxydatif.....	54
1.8.2.3.1	<i>Groupement Fe-S</i> .....	55
1.8.2.3.2	<i>Systèmes de production des groupements Fe-S et leur régulation</i> .....	55
1.8.2.4	Rôles de RyhB dans la virulence bactérienne .....	57
<b>Chapitre 2. Matériel et méthodes</b> .....	<b>59</b>	
2.1	Souches bactériennes .....	60
2.2	Milieux et conditions de croissance .....	61
2.3	PCR (Réaction de polymérisation en chaîne) .....	61
2.4	La mutagenèse.....	63
2.5	Délétion de la cassette de résistance à l'antibiotique .....	64

2.6	Complémentation .....	65
2.6.1	Complémentation au site <i>attTn7</i> .....	66
2.6.1.1	Plasmides de clonage .....	66
2.6.1.2	Plasmides de complémentation .....	67
2.6.1.3	Transposition au site <i>attTn7</i> .....	69
2.6.2	Complémentation au site <i>lac</i> .....	72
2.7	Infection du tractus urinaire des souris CBA/J .....	73
2.8	Courbes de croissance .....	74
2.9	Test de survie bactérienne au peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	75
2.10	Analyses LC-MS/MS .....	76
2.11	Analyses statistiques .....	76
<b>Chapitre 3. Résultats</b> .....		77
3.1	Infection du tractus urinaire de souris CBA/J .....	78
3.2	Courbes de croissance .....	81
3.3	Test de survie au peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	84
3.4	La production de sidérophores .....	86
<b>Chapitre 4. Discussion</b> .....		89
4.1	Infection du tractus urinaire de souris CBA/J .....	90
4.2	Courbes de croissance .....	93
4.3	Test de survie au peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) .....	97
4.4	La production de sidérophores .....	101
<b>Conclusion</b> .....		106
<b>Références</b> .....		108

## Introduction

Il existe une variété de souches bactériennes pathogènes *Escherichia coli* qui causent des maladies infectieuses. Parmi les différents pathotypes, il y a majoritairement les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) (Russo et Johnson, 2003; Kaper *et al.*, 2004). Les ExPEC engendrent, chez les humains et les animaux, diverses maladies extra-intestinales telles que les infections urinaires, la septicémie, la méningite néonatale et la colibacillose chez la volaille (Dozois et Curtiss, 1999; Russo et Johnson, 2003). Les infections du tractus urinaire (ITUs) sont, quant à elles, une des infections acquises les plus communes dans les pays industrialisés, affectant ainsi négativement la santé publique et l'industrie agricole (Foxman *et al.*, 2000; Russo et Johnson, 2003; Belanger *et al.*, 2011). Ce type d'infection peut causer une cystite (infection de la vessie), une pyélonéphrite (infection des reins) ou une bactériémie (infection sanguine) (Mulvey, 2002; Kaper *et al.*, 2004). Les « uropathogenic *E. coli* » (UPEC), un sous-groupe d'ExPEC, sont majoritairement responsables des ITUs (Russo et Johnson, 2003; Kaper *et al.*, 2004).

Les UPEC possèdent des mécanismes de virulence qui leur permettent de contrer le système immunitaire de l'hôte et les barrières physiques du système urinaire, contrairement aux souches commensales. Ce milieu peu propice à la prolifération bactérienne, est limité en fer. Il existe ainsi des systèmes de régulation de l'homéostasie du fer bactérien, car il est un élément essentiel pour la survie de la majorité des organismes vivants. En effet, ce métal de transition est impliqué dans plusieurs réactions métaboliques et biologiques. En conditions physiologiques, le fer est retrouvé sous deux formes : le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Griffiths, 1999; Andrews *et al.*, 2003). Ce dernier est extrêmement insoluble dans un milieu aérobie. Ainsi, il est non utilisable et peu disponible pour diverses réactions ou utilisation. Ce phénomène procure une forme de protection à l'organisme en raison du fait que le fer peut être hautement toxique en présence d'oxygène (Andrews *et al.*, 2003). En effet, la combinaison de fer et d'oxygène engendre un stress oxydatif, et ce, en formant un niveau élevé de radicaux libres dommageables pour les cellules. Somme toute, la faible quantité de fer disponible et son potentiel de toxicité sont des facteurs limitants pour la croissance des microorganismes.

Ainsi, les bactéries, et autres organismes, ont développé des systèmes de régulation afin de maintenir un apport de fer suffisant tout en contrôlant sa toxicité. Chez les mammifères, le fer est complexé à des protéines de haute affinité (par exemple la transferrine) assurant l'homéostasie du fer. La séquestration du fer par les ferroprotéines chez l'hôte diminue donc davantage la disponibilité de ce métal pour les microorganismes et ce, également durant l'infection (Griffiths, 1999; Ratledge et Dover, 2000). Pour dépasser ces contraintes, les bactéries pathogènes, telles que les UPEC, possèdent une variété de systèmes d'acquisition du fer, dont les sidérophores et leurs récepteurs respectifs (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003). Ce sont des molécules de faible poids moléculaire ayant une grande affinité pour le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ) (Andrews *et al.*, 2003). Ainsi, en cas de besoin en fer, les sidérophores sont excrétés par les bactéries afin de s'approprier le  $\text{Fe}^{3+}$  contenu dans les ferroprotéines de l'hôte (Andrews *et al.*, 2003). Il existe une variété de sidérophores classés en différentes catégories selon leur structure moléculaire (Payne et Mey, 2004). L'entérobactine, l'aérobactine, les salmochélines et l'yersiniabactine sont les principaux sidérophores excrétés par *E. coli* (Crosa et Walsh, 2002; Miethke et Marahiel, 2007). Leurs rôles individuels et combinés pour la virulence des souches ExPEC ont été le sujet de diverses études.

En plus du transport ferrique, il existe d'autres mécanismes de virulence extra-intestinaux, dont la défense contre le stress oxydatif. Les pathogènes sont ainsi munis de systèmes de défense qui leur permettent de survivre à certaines conditions, telles que la génération de radicaux libres par le système immunitaire inné de l'hôte et le potentiel de toxicité du fer. Chez *E. coli*, les principaux régulateurs de l'homéostasie du fer sont impliqués positivement ou indirectement dans la régulation de la réponse au stress oxydatif (Zheng *et al.*, 1999). Par conséquent, en présence d'excès de fer et de radicaux libres, les mécanismes d'acquisition de fer sont réprimés et contrôlés.

De ce fait, la régulation des divers mécanismes responsables de l'acquisition et de l'entreposage ferrique ainsi que de la défense contre le stress oxydatif est importante afin de maintenir l'homéostasie du fer bactérien. Le principal régulateur protéique chez *E. coli* est Fur (« *Ferric uptake regulator* ») (Andrews *et al.*, 2003; de Lorenzo *et al.*, 2004). Fur est une protéine homodimère qui agit comme un régulateur transcriptionnel négatif lorsqu'il est lié à son co-répresseur le  $\text{Fe}^{2+}$  (Hantke, 2001). Ainsi, en présence de fer, Fur possède la conformation active (dimérisation) qui lui

permet de se lier à l'ADN (Andrews *et al.*, 2003; de Lorenzo *et al.*, 2004; Coy et Neilands, 1991). Il contrôle l'expression de plus de 90 gènes connus à ce jour, dont principalement ceux impliqués dans le transport et l'acquisition du fer (Andrews *et al.*, 2003). Par conséquent, lorsque la concentration en fer intracellulaire dans la bactérie est optimale ou élevée, Fur est activé et il réprime l'acquisition de fer en empêchant la transcription des gènes codant pour les systèmes de sidérophores. Plusieurs gènes codant pour la synthèse des ferroprotéines sont aussi positivement régulés par la protéine Fur (Masse *et al.*, 2007). En effet, il a été découvert chez *E. coli* K-12 non pathogène, un système de régulation de fer particulier : dans un milieu où la quantité de fer est suffisante, Fur réprime l'expression d'un petit ARN non codant nommé RyhB (Masse et Gottesman, 2002). Celui-ci a pour fonction d'empêcher la transcription de plusieurs gènes codant pour des protéines (non-essentiels) de stockage de fer en assurant la dégradation d'ARNm cibles (Masse *et al.*, 2005; Masse *et al.*, 2007). À l'inverse, lorsque la concentration de fer intracellulaire est faible, le gène *ryhB* est activé, car Fur, inactif, ne peut l'inhiber.

Plusieurs études antérieures sur les divers mécanismes de transport et d'acquisition de fer en lien avec la protéine Fur et l'ARN RyhB ont été faites chez *E. coli* K-12 non pathogène. À ce jour, les rôles individuels et combinés de ces deux régulateurs concernant la production de sidérophores, la résistance au stress oxydatif et la virulence chez des souches ExPEC n'ont pas encore été étudiés. Ainsi, les objectifs de ce projet consistent à étudier ces rôles chez une souche ExPEC, soit la souche uropathogène CFT073, en générant des mutations aux niveaux des gènes *fur* et *ryhB*. L'hypothèse est que les régulateurs Fur et RyhB jouent un rôle individuel et cumulatif dans la virulence extra-intestinale chez *E. coli*.

Ce mémoire présente, tout d'abord, les aspects généraux qui sont utiles pour la compréhension du sujet d'étude, soient les caractéristiques des souches UPEC, les facteurs de virulence, les mécanismes d'acquisition et d'entreposage du fer, les mécanismes de défense contre le stress oxydatif ainsi que les principaux régulateurs de l'homéostasie du fer chez *E. coli*. Suite à la revue de littérature, le protocole expérimental, les résultats ainsi que l'analyse de ces derniers sont présentés afin d'élaborer et de définir les applications concrètes qu'a apporté ce projet d'étude.

## **Chapitre 1. Revue de littérature**

## 1.1 *Escherichia coli*

La microflore digestive humaine se caractérise par sa complexité et sa diversité. L'ensemble des microorganismes qui la compose assure l'homéostasie et la santé de l'hôte par le biais de relations symbiotiques. En effet, outre la présence de diverses espèces microbiennes, elle est principalement composée de bactéries anaérobies strictes et d'une proportion de bactéries anaérobies facultatives. Parmi ces dernières, il y a les bactéries du genre *Escherichia coli* (*E. coli*), des bacilles Gram négatifs et versatiles, qui font partie de la famille des *Enterobacteriaceae* (entérobactéries) (Sussman, 1997). *E. coli* est un organisme commun de la microflore commensale intestinale de l'humain et de plusieurs mammifères. Les souches d'*E. coli* commensales colonisent le tractus gastro-intestinal du nouveau-né suivant les quelques heures après sa naissance (Sussman, 1997). Celles-ci ne présentent généralement aucun risque pour la santé des humains et procurent plusieurs effets bénéfiques à l'hôte tels que l'apport de nutriments, une régulation immune et une protection en cas de colonisation par des souches pathogènes. Toutefois, il existe aussi plusieurs souches d'*E. coli* pathogènes qui peuvent causer des maladies chez des individus en bonne santé, dans le cas où la barrière gastro-intestinale est altérée et surtout chez les immunodéprimés (Kaper *et al.*, 2004).

Il existe ainsi une diversité de souches d'*E. coli* non pathogènes et pathogènes chez diverses espèces animales et plusieurs méthodes sont disponibles pour les étudier et les classifier.

### 1.1.1 La collection KEIO

La collection KEIO regroupe une diversité de clones *E. coli* K-12 (non-pathogènes) présentant des délétions simples de gènes non-essentiels générées grâce au système de recombinaisons  $\lambda$  Red (l'approche est détaillée dans la section matériel et méthode) (Datsenko et Wanner, 2000; Baba *et al.*, 2006). Des 4288 gènes ciblés 3985 ORFs ont été mutés. Ces gènes codent probablement pour des gènes non essentiels de la bactérie, tandis que les 303 autres gènes (dont 37 ont des rôles inconnus) coderaient pour des gènes essentiels, car aucun mutant n'y a été trouvé. Ainsi, cette banque de mutants a été créée dans le but de procurer une nouvelle ressource pour étudier les

conséquences et les effets de la perte d'un gène spécifique dans différentes conditions et pour en déterminer leur rôle potentiel. Son utilisation est donc combinée à une approche génomique systémique et fonctionnelle (Baba *et al.*, 2006). Jusqu'à ce jour, différentes études se sont servies de cette collection afin d'étudier la fonction d'un gène non caractérisé et l'analyse du métabolisme bactérien. En effet, différents groupes de clones de la collection ainsi que des milliers de mutants individuels ont déjà été mondialement distribués. La distribution est gérée via le site de GenoBase (<http://ecoli.aist-nara.ac.jp/>) de concert avec les différentes données et les autres ressources fournies par la banque ASKA (A complete Set of E. coli K-12 ORF Archive) (Kitagawa *et al.*, 2005). Les souches sont aussi maintenant distribuées par Yale (*Escherichia coli* genetic stock center).

La collection KEIO ainsi que la méthode de délétion génique par recombinaisons  $\lambda$  Red peuvent être utilisées non seulement pour étudier la bactérie *E. coli*, mais aussi pour élargir l'étude de propriétés des différents gènes pouvant être retrouvés dans divers organismes.

### 1.1.2 La classification sérologique

La classification sérologique est un moyen pour distinguer les différentes souches d'*E. coli*. Celle-ci est établie en fonction de la composition antigénique de la surface bactérienne des souches, soit la présence de l'antigène O, K ou H. Il existe une grande variabilité de ces antigènes chez *E. coli*. En effet, plus de 167 antigènes O, plus de 80 antigènes K et plus de 50 antigènes H ont été identifiés (Whitfield et Roberts, 1999). Tout d'abord, l'antigène O est contenu dans les lipopolysaccharides (LPS) présents sur la paroi bactérienne (Stenutz *et al.*, 2006). Les LPS sont composés du lipide A, situé dans la membrane, du polysaccharide central et de la chaîne latérale O, ou antigène O. Les antigènes K sont des polysaccharides acides et ils composent la capsule bactérienne (Whitfield et Roberts, 1999). Finalement, les antigènes H sont de nature protéique et ils entrent dans la composition de la structure flagellaire, celle-là même qui permet la mobilité bactérienne (Wiles *et al.*, 2008).

### 1.1.3 La collection ECOR

La collection ECOR (« *Escherichia coli reference collection* ») a été présentée par leurs fondateurs Ochman et Selander en 1984. Cette approche phylogénétique permet de mettre en relation les différentes souches d'*E. coli* commensales et pathogènes avec un ancêtre commun. En effet, elles regroupent 72 souches d'*Escherichia coli* isolées d'une variété d'hôtes (animaux et humains) et provenant de différentes localisations géographiques (Ochman et Selander, 1984). La totalité des souches sélectionnées a été classée en cinq groupes distincts : A, B1, B2, D et E. Ce classement a été effectué grâce à la technique « *Multilocus enzyme electrophoresis* » (MLEE). Celle-ci permet l'analyse des séquences d'ADN des gènes métaboliques conservés en utilisant 38 enzymes métaboliques. Les groupes A et B1 sont les plus proches et les plus récents. Plus précisément, le groupe A regroupe la majorité des souches commensales et K-12 (non pathogènes) provenant de sources humaines. Les isolats originaires des mammifères autres que les primates sont davantage classés dans le groupe B1 (Herzer *et al.*, 1990; Duriez *et al.*, 2001). Les souches possédant le plus grand génome, dû à la présence des îlots de pathogénicité, sont classées dans le groupe B2 et D (section 1.2). Tout particulièrement, le groupe B2 englobe la majorité des souches responsables des infections extra-intestinales (Russo et Johnson, 2000; Johnson et Russo, 2002). De plus, comme ce groupe est le plus ancien, il possède donc la plus haute diversité génétique de la gamme.

Ainsi, le groupe A et B1 regroupent principalement des souches avirulentes, le groupe B2 et D regroupent des souches hautement et moyennement virulentes, respectivement. Les souches non catégorisées à ce jour et celles ayant des origines différentes des autres groupes sont classées dans le groupe E (Herzer *et al.*, 1990).

## 1.2 *Escherichia coli* pathogènes

Les différents pathotypes d'*E. coli* engendrent des maladies chez un individu en bonne santé. À la différence des souches commensales, les *E. coli* pathogènes possèdent des facteurs de virulence qui leur confèrent une bonne adaptation à de nouvelles niches de colonisation et la capacité à causer une infection (Kaper *et al.*, 2004). La comparaison des génomes de la souche *E. coli* K-12 (non pathogène) et de

la souche UPEC CFT073 a mis en évidence la différence de taille, la première étant de 4.6Mb et la seconde de 5.2Mb, qui révèle l'addition de matériel génétique pouvant coder pour des facteurs de virulence. L'analyse a permis de constater que 74% du génome de la souche K-12 est identique à celui de la souche UPEC. Une comparaison a aussi été faite avec la souche entérohémorragique O157:H7, agent causant des colites hémorragiques. Celle-ci a un génome d'une taille d'environ de 5.5Mb. La comparaison a démontré une différence au niveau du génome bactérien, mais aussi une forte homologie entre la souche commensale (environ 4.1Mb), indiquant que les différentes souches d'*E. coli* possèdent un certain nombre de gènes communs, qui ont été conservés au cours de l'évolution (Welch *et al.*, 2002). En plus de la présence d'une différence génomique entre les différentes souches causant des maladies et celle qui est non pathogène, il a été démontré qu'il existe une grande variabilité entre les souches d'*E. coli* causant le même type d'infection (ex. les souches UPEC CFT073 et 536) (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Marrs *et al.*, 2005).

Les facteurs de virulence retrouvés chez les souches pathogènes sont encodés par des portions d'ADN présents sur des îlots de pathogénicité (PAIs) acquis au fil du temps par transfert horizontal. En effet, des études ont mis en évidence que la présence de certains facteurs de virulence retrouvés chez les UPEC (ex. CFT073 et 536) est associée à divers PAIs (Rasko *et al.*, 2001; Oelschlaeger *et al.*, 2002). Cette acquisition distincte de matériel génétique peut se faire soit par l'entremise de plasmide ou de bactériophage, donc d'une provenance extérieure. Il existe diverses méthodes d'incorporation telles que la transformation, la conjugaison ou les éléments mobiles auto-intégrants (ex. : les transposons) (Groisman et Ochman, 1996; Dozois et Curtiss, 1999). La présence de ces PAIs modifierait ainsi le potentiel pathogène des souches.

### **1.2.1 Les pathotypes *E. coli***

Il existe une variété de souches *E. coli* pathogènes qui ont la capacité de causer des maladies infectieuses. Quatre symptômes cliniques généraux d'une infection causée par ce groupe de pathogènes sont retrouvés : des maladies entériques et/ou diarrhéiques, les infections du tractus urinaire (ITUs), la septicémie et la méningite

chez les nouveau-nés. Ces souches peuvent être classées en deux grandes familles selon le lieu d'infection : les pathogènes intestinaux (IPEC) et les pathogènes extra-intestinaux (ExPEC) (Russo et Johnson, 2003; Kaper *et al.*, 2004).

Les IPEC ont la capacité de causer des maladies gastro-intestinales chez les humains et les animaux incluant les diarrhées persistantes, endémiques et épidémiques ainsi que les colites hémorragiques. Ces maladies surviennent principalement dans les pays développés, à quelques exceptions près. Il existe six sous-catégories d'IPEC qui sont bien caractérisées : les *E. coli* entérotoxigéniques (ETEC), les *E. coli* entérohémorragiques (EHEC), les *E. coli* entérotoxigènes (EPEC), les *E. coli* entéroaggrégatives (EAEC), les *E. coli* d'adhérence diffuse (DAEC) et les *E. coli* entéroinvasives (EIEC) (Dozois et Curtiss, 1999; Kaper *et al.*, 2004; Miquel *et al.*, 2010).

Les ExPEC ont la capacité de coloniser et d'infecter à l'extérieur du système intestinal. Ces pathotypes engendrent diverses maladies extra-intestinales chez l'humain et divers animaux. À chaque année, des milliards de dollars sont investis dans leur traitement et dans les frais hospitaliers qu'elles engendrent. De plus, des centaines de milliers de personnes perdent la vie suite à des complications et divers symptômes causés par les souches ExPEC (Russo et Johnson, 2000). Il existe une variété de catégories qui regroupent les souches selon le lieu et la cause de l'infection. Principalement, il y a les souches uropathogènes (UPEC) responsables des infections du tractus urinaire chez les humains et chez certains mammifères, les souches responsables de la méningite et de la septicémie néonatale (NMEC) et les souches pathogènes aviaires (APEC) causant différentes maladies chez la volaille (par exemple : la colibacillose aviaire) (Dozois et Curtiss, 1999; Russo et Johnson, 2003; Belanger *et al.*, 2011). Ces dernières amènent à d'importantes pertes économiques agricoles (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Belanger *et al.*, 2011).

### **1.3 Les infections du tractus urinaire par les UPEC**

Les infections du tractus urinaire (ITUs) engendrent un impact important tant sur le plan économique que médical en raison du fait qu'elles sont une des infections acquises les plus communes dans les pays industrialisés (Foxman, 2002; Russo et

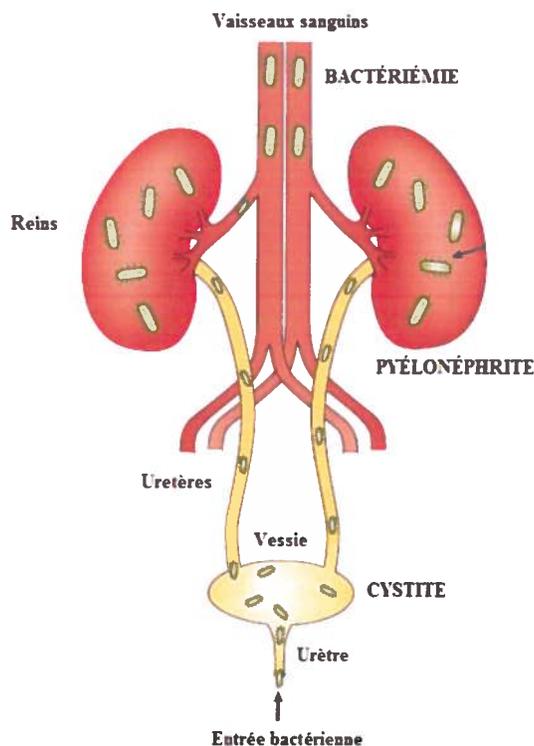
Johnson, 2003). Comme l'urètre de la femme est plus petit que celle des hommes, elles sont davantage affectées par les ITUs. Une femme a environ 60% plus de risque d'avoir une ITU au cours de sa vie; d'autant plus qu'environ 20% à 30% des femmes vont subir des épisodes de récurrence (Foxman, 2002; Marris *et al.*, 2005). Des milliards de dollars sont ainsi investis à chaque année aux États-Unis dans le traitement de ce type d'infection (Foxman, 2002; George et Manges, 2010). En revanche, malgré le fait qu'il existe certains traitements efficaces contre les ITUs, le risque potentiel d'une émergence de souches résistantes aux antibiotiques peut amener les spécialistes à faire face à une autre problématique médicale (Ronald *et al.*, 2001; Johnson *et al.*, 2002b).

Les ITUs peuvent être causées par une diversité d'espèces telles que *Klebsiella* spp., *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis* et *Pseudomonas aeruginosa*. Par contre, elles sont majoritairement causées par un sous-groupe d'ExPEC : les UPEC pour « *uropathogenic E. coli* ». En effet, *E. coli* est la principale cause de ce type d'infection avec environ 80 à 85% des cas (Russo et Johnson, 2003). Il a été énoncé que les uropathogènes proviendraient de sources commensales car ils font généralement partie de la flore normale de l'intestin. En revanche, lorsqu'ils se retrouvent au niveau du tractus urinaire via une contamination de la région urogénitale par la flore fécale ou par une source externe, ils ont la capacité d'être virulents via l'activation de leurs gènes de virulence spécifiques (Kaper *et al.*, 2004).

### 1.3.1 Généralités sur les ITUs

Il existe plusieurs manifestations cliniques causées par les ITUs. Tout d'abord, chez la majorité des femmes en santé, ce type d'infection se produit de manière ascendante (Figure 1.1) (Kaper *et al.*, 2004). Suite à l'établissement de la bactérie uropathogène au niveau de la région vaginale, celle-ci peut se rendre à la vessie par l'urètre et donc causer une cystite. Ce type d'infection localisée est généralement symptomatique. Elle se traduit par une douleur à la miction et une grande fréquence d'uriner. Par la suite, si le cas s'aggrave, la bactérie pathogène peut atteindre les reins de la victime via ses uretères et causer ainsi une pyélonéphrite. Des symptômes graves tels que la fièvre et des vomissements accompagnent régulièrement ce type

d'infection. Si le cas n'est pas traité ou qu'il y a présence de complications internes, une bactériémie peut survenir, c'est-à-dire une infection potentiellement fatale au niveau du sang de la patiente (Mulvey, 2002). Il existe aussi les ITUs de types descendantes, mais elles sont plutôt rares et sont généralement causées par certaines espèces du genre *Staphylococcus*, *Salmonella* et *Candida* (Ronald, 2002).



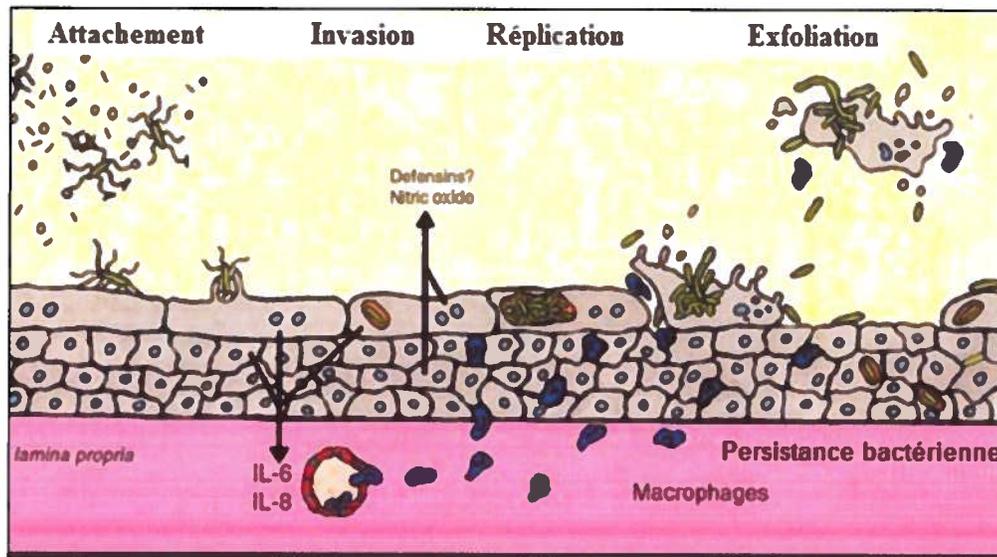
**Figure 1.1 : Infection ascendante du tractus urinaire (Kaper *et al.*, 2004).**

Il existe une sous-population d'individus, dont la majorité est composée de femmes, qui possèdent une plus grande prédisposition aux ITUs. Parmi ce groupe, il y a ceux présentant une anomalie fonctionnelle au niveau du tractus urinaire, une défaillance au niveau des reins ou encore la présence d'un corps étranger (ex. transplantation d'organe ou un cathéter) (Foxman *et al.*, 2000; Hooton, 2003). Il y a aussi les personnes diabétiques et celles ayant un système immunitaire affecté soit par une infection chronique ou par des prédispositions génétiques (Foxman, 2002). De plus, les effets hormonaux chez la femme affectent aussi sa prédisposition à ce type

d'infection. L'œstrogène a la capacité de diminuer le pH vaginal, ce qui présente un effet protecteur contre les bactéries uropathogènes. En effet, il a été démontré que la présence d'un haut taux de production de cette hormone, comme chez les femmes fécondes ou au cours d'une période du cycle menstruel, diminue la susceptibilité aux ITUs. Cela est due au fait que l'adhérence bactérienne aux cellules épithéliales est plus faible lors du pic d'œstrogène. Ainsi, les femmes prépubères et les femmes ménopausées qui produisent moins d'œstrogène sont plus à risque d'avoir une ITU. Les femmes enceintes montrent aussi une susceptibilité plus grande à ce type d'infection. (Hooton *et al.*, 1996; Schaeffer *et al.*, 2001; Foxman, 2002).

### **1.3.2 Le système urinaire**

Le système urinaire est un environnement inhospitalier pour les bactéries pathogènes. En effet, leur présence dans ce milieu déclenche le système immunitaire de l'hôte ce qui a pour effet de recruter des cellules lymphocytaires. Elles sont responsables de l'élimination du pathogène en promouvant la phagocytose et l'inhibition de l'adhésion bactérienne (Schilling *et al.*, 2001). Il existe ainsi une importante interaction entre le système de défense innée de l'hôte et les UPEC (Figure 1.2). Par ailleurs, la composition du système urinaire est en soi une bonne protection. En effet il y a le tissu épithélial qui, par l'ensemble des couches de cellules, confère une bonne étanchéité et qui, par la présence de divers facteurs protéiques, interfère dans l'adhésion bactérienne (Mulvey *et al.*, 2000). Il y a aussi l'urine qui, par son acidité et sa forte concentration en sels et en urée, participe à l'inhibition de la croissance bactérienne. Les bactéries doivent également adhérer aux structures de l'hôte car elles risquent d'être expulsées par le constant flux d'urine (Schilling *et al.*, 2001; Snyder *et al.*, 2004).

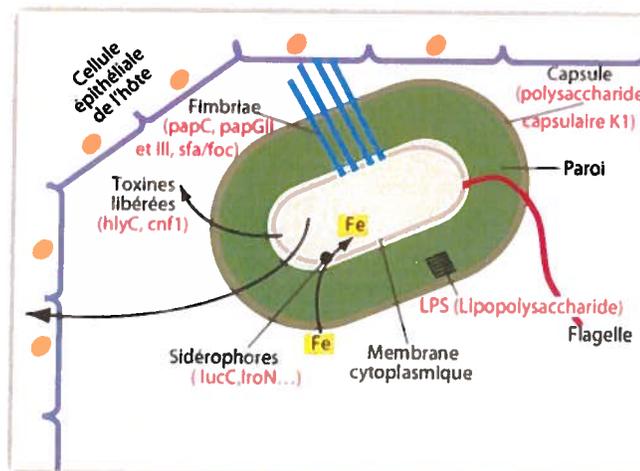


**Figure 1.2 : Modèle d'une interaction entre le système de défense innée de l'hôte et les UPEC dans la vessie.** Les UPEC (en vert) s'attachent et envahissent les cellules uroépithéliales de l'organe (en gris). Ceci déclenche le système immunitaire de l'hôte, permettant le recrutement de macrophages (en bleu). Les UPEC continuent à se multiplier et, suite à l'exfoliation des cellules infectées, forment des réservoirs intracellulaires permettant la persistance bactérienne. (Mulvey *et al.*, 2000).

Il existe ainsi plusieurs facteurs présents dans cet environnement hostile empêchant la colonisation des bactéries pathogènes. Parmi ceux-là, un des plus limitant à l'établissement d'une infection est la biodisponibilité du fer dans le milieu. Cet important métal est complexé à des ferroprotéines ou alors séquestré à l'intérieur des cellules de l'hôte, ce qui le rend très peu disponible pour les uropathogènes. Ces derniers sont donc constamment en compétition pour l'obtention du fer qui est capital à leur survie (Snyder *et al.*, 2004). Les souches UPEC doivent donc posséder des mécanismes de virulence qui leur permettraient de contrer le système immunitaire de l'hôte ainsi que les barrières physiques du système urinaire et de causer une infection extra-intestinale (Snyder *et al.*, 2004; Hagan *et al.*, 2010).

#### 1.4 Facteurs de virulence chez les ExPEC

Les microorganismes pathogènes possèdent des gènes spécifiques codant pour des facteurs qui leur permettent de contrer les barrières physiques et immunitaires de l'hôte et d'ainsi causer une infection. Tel que mentionné précédemment, les régions génétiques ou « îlots de pathogénicité » qui codent pour ces facteurs de virulence sont localisés soit sur le chromosome bactérien ou sur des plasmides de virulence (Dozois et Curtiss, 1999; Hacker et Kaper, 2000). Chez les ExPEC, il y en a une vaste gamme; chacun a des rôles tout autant spécifiques et importants les uns que les autres pour l'établissement d'une infection extra-intestinale (Figure 1.3). En effet, parmi ces facteurs, il y a particulièrement les facteurs d'adhésion, les systèmes de capture de nutriments essentiels, les toxines, les autotransporteurs, les polysaccharides capsulaires, la résistance au sérum, le sérotype et des structures de surface responsables de la formation de biofilms (Johnson et Russo, 2005; Wiles *et al.*, 2008).



**Figure 1.3 : Divers exemples de facteurs de virulence présents chez les ExPEC et contribuant au processus infectieux (Jauregui, 2009).**

Le tableau 1.1 regroupe une diversité de facteurs dont la présence et la fonction ont été associées à la virulence *in vivo* chez au moins un groupe d'ExPEC, incluant les UPEC, NMEC et APEC, et ce, selon différentes études.

**Tableau 1.1 : Facteurs associés à la virulence *in vivo* chez les sous-groupes d'ExPEC (adapté de Johnson et Russo, 2005 et Wile *et al.*, 2008)**

<b>Catégories</b>	<b>Rôles globaux</b>	<b>Gène(s) ou opéron</b>	<b>Produit (s)</b>
Adhésines	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Nécessaire à l'étape d'initiation de l'adhérence cellulaire</li> </ul>	<i>fim</i>	Fimbriae de type 1 (D-mannose-Spécifique)
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fixation aux structures et/ou tissus de l'hôte</li> </ul>	<i>sfa</i>	Fimbriae S
		<i>foc</i>	Fimbriae FIC
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Impliquées dans la formation de biofilm (<i>fim</i>)</li> </ul>	<i>afa/dra</i>	Adhésines Dr-antigène-spécifique
		<i>pap</i>	Fimbriae P (pili)
		<i>iha</i>	Adhésine et récepteur de catécholates
		<i>csgA</i>	Curli
Acquisition :	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acquisition de fer, un métal important pour le métabolisme de base bactérien</li> </ul>	<i>entF</i>	Synthèse de l'entérobactine
		<i>iroN</i>	Récepteur de catécholates
a) Fer		<i>ireA</i>	Récepteur de catécholates
		<i>iuc, iutA</i>	Synthèse et récepteur de l'aérobactine (sidérophore)

<i>tonB</i>	Transport énergétique des sidérophores
<i>chuA</i>	Récepteur du système de transport de l'hème
<i>hma</i>	
<i>sit</i>	Système de transport de type ABC du fer/manganèse
<i>irp, fyuA</i>	Récepteur et synthèse de la yersiniabactine (sidérophore)
<i>znu</i>	Système de transport de type ABC du zinc
<i>pst</i>	Système de transport du phosphate
<i>guaA</i>	Synthèse de la guanine
<i>argC</i>	Synthèse de l'arginine
<i>hly</i>	Alpha-hémolysine
<i>CNF1</i>	Facteur nécrotique cytotoxique 1

b) Autres nutriments

- Acquisition de nutriments essentiels à la croissance et/ou la survie bactérienne
- Synthèse de nutriments utiles pour la croissance bactérienne dans l'urine humaine (*guaA* et *argC*)

Toxines

- Dommages aux cellules de l'hôte
- Contribution à la réponse inflammatoire du système immunitaire

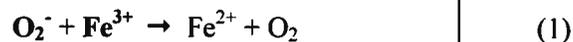
Autotransporteurs	• Systèmes de sécrétion	<i>vat</i>	Autotransporteur sérine-protéase (toxine vacuolaire)
	• Propriétés adhésives		
	• Autoagrégation entre les cellules	<i>sat</i>	Autotransporteur sérine-protéase (toxine sécrétée)
	• Propriétés cytotoxiques pour <i>vat</i> , <i>sat</i> et protéolytique pour <i>tsh</i> et <i>pic</i>	<i>pic</i> , <i>tsh</i>	Autotransporteurs sérine-protéases
Protectines	• Encapsulation : protection du système immunitaire	<i>kps MT II</i>	Synthèse de capsules polysaccharide groupe II
	• Résistance au sérum	<i>kps MT III</i>	Synthèse de capsules polysaccharides groupe III
	• Osmoprotection	<i>rfc</i>	Synthèse du lipopolysaccharide O4 (LPS)
		<i>proP</i>	Proline perméase
		<i>iss</i>	Protéine de la membrane externe

## 1.5 L'importance du Fer

Les systèmes d'acquisition du fer sont importants, car le fer est un élément essentiel pour la survie de la majorité des organismes. Ce métal de transition est impliqué dans plusieurs réactions métaboliques et biologiques, telles que la photosynthèse, le transport d'oxygène, la régulation génique et la biosynthèse de l'ADN. En conditions physiologiques, le fer est incorporé aux protéines afin d'assurer sa stabilité. Il est majoritairement retrouvé sous deux formes : le fer ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) et le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Contrairement au fer ferreux, le fer ferrique, qui est extrêmement insoluble en condition aérobie ( $10^{-18}\text{M}$  à pH 7,0), est la forme prédominante dans ce milieu. Malgré le fait qu'il soit un des métaux les plus abondants sur Terre, il est peu disponible pour les microorganismes dans les niches écologiques. Ceci est une forme de protection adoptée par l'hôte, car le fer peut être hautement toxique en présence d'oxygène. En effet, il agit comme catalyseur dans la réaction de Haber-Weiss qui mène à la formation de radicaux libres ( $\text{HO}^\bullet$ ) (Griffiths, 1999; Andrews *et al.*, 2003).



Cette réaction est la résultante d'une combinaison de deux autres réactions soit la réduction du fer ferrique en fer ferreux (1) ainsi que l'oxydation du fer ferreux en fer ferrique (réaction de Fenton) (2).



Dans les trois cas, la présence d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), soit l'anion superoxyde  $\text{O}_2^-$  et le peroxyde d'hydrogène  $\text{H}_2\text{O}_2$ , avec le fer amène à la production du radical hydroxyle  $\text{HO}^\bullet$ . Les ROS, et particulièrement le radical  $\text{HO}^\bullet$ , sont extrêmement toxiques pour la cellule bactérienne en raison du fait qu'ils causent des

dommages à diverses molécules organiques cellulaires, dont l'ADN (Griffiths, 1999; Andrews *et al.*, 2003)

### 1.5.1 Protéines liant le fer chez l'hôte

En raison du potentiel de toxicité ainsi que de l'importance du fer en tant que cofacteur pour diverses réactions métaboliques de base, la quantité de fer libre et son utilisation sont régulées par des mécanismes assurant une homéostasie. De plus, lors d'une infection, le fer est important à la survie de la bactérie pathogène. De ce fait, l'hôte infecté minimise la disponibilité de ce métal afin de se protéger (Griffiths, 1999). Chez les mammifères, ce contrôle est assuré par des protéines spécifiques qui se lient avec une grande affinité au fer libre. Tout d'abord, il y a la famille des transferrines qui assure cette fonction chez la majorité des vertébrés. Elle est constituée de la transferrine du sérum, de la lactoferrine retrouvée dans les fluides extracellulaires et de l'ovalbumine, retrouvée dans l'albumen des œufs d'oiseaux. Cette famille regroupe des glycoprotéines monomériques possédant une constante d'affinité très grande de l'ordre de  $10^{-20}$  M. (Ratledge et Dover, 2000; Crichton *et al.*, 2002; Andrews *et al.*, 2003). Il existe aussi la ferritine qui est présente chez diverses espèces eucaryotes et surtout chez les microorganismes. Cette protéine de séquestration est formée d'un complexe sphérique de 24 sous-unités qui lui permet de lier une très grande quantité d'ions ferriques (Harrison et Arosio, 1996; Ratledge et Dover, 2000). De plus, il existe de nombreuses autres protéines chez les mammifères qui permettent de diminuer la concentration de fer disponible, dont l'hème et l'hémoglobine. Celles-ci utilisent plutôt ce métal afin d'accomplir leurs fonctions biologiques (Schaible et Kaufmann, 2004; Hagan et Mobley, 2009).

En résumé, en plus de son potentiel de toxicité en présence d'oxygène, le fer libre chez l'hôte (humain et animal) est peu disponible. Plus précisément, la concentration de fer disponible est environ de l'ordre de  $10^{-24}$  M tandis que les cellules bactériennes ont besoin de maintenir une concentration interne entre  $10^{-7}$  M à  $10^{-5}$  M afin d'assurer leur survie (Braun et Braun, 2002; Andrews *et al.*, 2003). Parmi ces microorganismes, il y a les bactéries pathogènes dont les UPEC qui, pour s'établir et infecter le tractus urinaire, doivent être en mesure d'acquérir la quantité de fer nécessaire à leur croissance. Le fer peut donc être considéré comme étant parmi les

nutriments les plus difficiles à acquérir par les pathogènes chez son hôte (Ratledge et Dover, 2000).

Ainsi, afin de croître et de survivre, les microorganismes vivants en présence d'oxygène doivent être en mesure de :

1. développer des stratégies afin d'acquérir le fer de leur environnement et de l'entreposer,
2. détoxifier les espèces réactives de l'oxygène dommageables,
3. réguler de très près les mécanismes de l'homéostasie du fer (acquisition et entreposage).

#### **1.6 Stratégies pour acquérir le fer chez les bactéries**

Il existe une diversité de facteurs qui affectent potentiellement la multiplication bactérienne *in vivo*, tels que la température, le pH, le taux d'oxygène et la disponibilité des nutriments. Un des mécanismes les plus étudiés est celui qui met en relation la croissance bactérienne avec la biodisponibilité du fer. Celle-ci affecte une panoplie de gènes dont certains de virulence, incluant ceux dépendants et indépendants des mécanismes dirigeant l'homéostasie de fer bactérienne (Griffiths, 1997).

Tel que mentionné précédemment, le fer est un élément essentiel pour la majorité des microorganismes. Toutefois, chez les souches *E. coli*, la concentration de fer nécessaire pour leur croissance optimale est hautement plus élevée que la concentration de fer disponible chez l'hôte humain (section 1.5.1). Il est donc primordial pour les bactéries d'être équipées de systèmes d'acquisition du fer.

Globalement, il existe quatre moyens d'acquisition de fer connus chez les bactéries (Andrews *et al.*, 2003) :

1. Réduction du fer ferrique en fer ferreux et son transport
2. Incorporation des protéines ferriques de l'hôte
3. Transporteurs de métaux de type ABC

#### 4. Utilisation de chélateurs de fer comme agents solubilisants

La réduction et la chélation sont les deux approches les plus adoptées par les bactéries en raison de leur efficacité.

##### 1.6.1 Acquisition du fer ferreux

La réduction du fer ferrique extracellulaire en fer ferreux ainsi que son transport peut être un moyen d'acquérir le fer. Cette activité réductase faciliterait le transport intracellulaire du fer ferreux pour la bactérie. Le système de transport de fer ferreux Feo, induit dans un milieu anaérobie et codé par les gènes *feoAB*, a été découvert pour la première fois chez une souche *E. coli*. Par la suite, il a été identifié chez tous les membres du groupe *Enterobacteriaceae*. Il est entre autres constitué de la protéine de transport de fer, FeoB (Kammler *et al.*, 1993; Andrews *et al.*, 2003). Il a été démontré que les mutants *feoB* chez *E. coli* et *Salmonella* sont atténués dans leur habileté à coloniser l'intestin de souris, due probablement à leur incapacité à transporter le fer ferreux dans ce milieu anaérobie. En revanche, l'absence de FeoB n'affecte pas la virulence de ces souches indiquant que l'acquisition du fer ferreux via ce système n'est pas celui employé par excellence par le pathogène durant l'infection (Stojiljkovic *et al.*, 1993; Tsolis *et al.*, 1996).

##### 1.6.2 Incorporation des protéines ferriques de l'hôte

Le fer peut aussi être acquis de manière plus indirecte et ce, en passant par les protéines ferriques de l'hôte, telles que la transferrine, la lactoferrine et l'hémoglobine. Cette internalisation est permise via des récepteurs spécifiques situés sur la membrane externe de la bactérie et énergisés par le complexe protéique TonB-ExbB-ExbD. Cette stratégie est employée par diverses espèces bactériennes, telles que *Neisseria meningitidis* et *Haemophilus influenzae* (Cornelissen et Sparling, 1994; Genco et Dixon, 2001). De plus, de nombreuses bactéries pathogènes gram négatives, incluant la souche UPEC CFT073, possèdent la capacité de capter l'hème directement du milieu extracellulaire grâce au récepteur ChuA (tableau 1.1; page 16) (Torres *et al.*, 2001). Récemment un nouveau récepteur de l'hème a aussi été identifié chez CFT073,

soit la protéine Hma (tableau 1.1; page 16). Il a été démontré que cette dernière est requise par la souche pour coloniser les reins de souris au cours d'une infection (Hagan et Mobley, 2009). Chez d'autres espèces, telle que *Pseudomonas aeruginosa*, l'hème complexé à la myoglobine et l'hémopexine est séquestré par des hémaphores et est internalisé via un système de récepteur-perméase membranaire (Letoffe *et al.*, 1998; Wandersman et Stojiljkovic, 2000).

### 1.6.3 Transporteurs de métaux de type ABC

Il existe aussi les transporteurs d'ions métalliques divalents de type ABC. Ces derniers ne requièrent pas de récepteurs spécifiques situés sur la membrane externe bactérienne ni de chélateurs de fer (par exemple : les sidérophores (section 1.6.4)). Plusieurs souches bactériennes utilisent ces transporteurs de manière efficace afin d'acquérir le métal qui lui est nécessaire (Andrews *et al.*, 2003). Parmi ceux qui permettent l'incorporation du fer, il y a le système SitABCD retrouvé principalement chez des souches entéropathogéniques telles que *Salmonella* et *Shigella* et chez certaines souches ExPEC, telle que  $\chi$ 7122 (APEC). Il y aussi le système YfeABCD chez *Yersinia pestis*, dont le système Sit en est un homologue ainsi que le système FbpABC chez *Neisseria gonorrhoeae* (Adhikari *et al.*, 1996; Bearden et Perry, 1999; Janakiraman et Schlauch, 2000; Sabri *et al.*, 2006). Les transporteurs de type Sit et Yfe sont aussi capables de transporter le manganèse, un cofacteur important pour diverses réactions enzymatiques chez les bactéries et autres organismes (Bearden et Perry, 1999; Sabri *et al.*, 2008).

### 1.6.4 Les sidérophores

Les systèmes spécifiques d'acquisition du fer chez les ExPEC sont importants pour ces microorganismes, de sorte que certains systèmes sont considérés comme des facteurs de virulence (tableau 1.1; page 15). Parmi ces derniers, il y a entre autres le dernier système de la liste (section 1.6; page 21) et non le moindre qui possède une approche adaptative permettant le transport et l'incorporation du fer ferrique extracellulaire : les sidérophores (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003). Les sidérophores

sont des molécules de faible poids moléculaire (< 1000 Da) possédant de grandes spécificité et affinité pour le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Ils ont la capacité de séquestrer le fer lié aux ferroprotéines de l'hôte pour ensuite le livrer à la bactérie via une série d'étapes spécifiques de transport. Ils sont retrouvés chez une grande variété d'organismes dont les bactéries, les levures, les moisissures et les plantes. Cette méthode d'acquisition du fer est largement répandue (Andrews *et al.*, 2003). Il existe une diversité de sidérophores qui sont classés selon leur structure chimique en 5 différentes catégories : les catécholates, les phénolates, les hydroxamates, les carboxylates et les structures mixtes (Payne et Mey, 2004). Les principaux sidérophores retrouvés chez les souches *E. coli* sont l'entérobactine, les salmochélines, l'aérobactine et la yersiniabactine (Crosa et Walsh, 2002; Miethke et Marahiel, 2007).

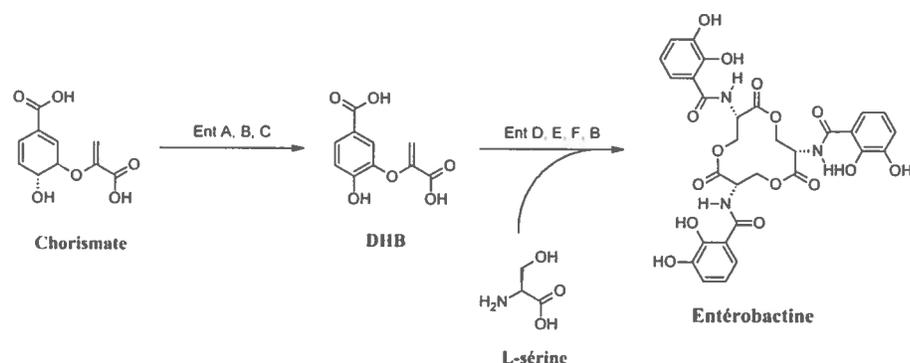
#### 1.6.4.1 L'entérobactine

L'entérobactine est un sidérophore de type catécholate qui séquestre le fer ferrique des ferroprotéines de l'hôte, telles que la transferrine et la lactoferrine (O'Brien et Gibson, 1970; Brock *et al.*, 1983). Sa grande constante d'affinité pour le fer ferrique, qui est de l'ordre de  $10^{-52}$  M révèle qu'il est un fort chélateur de fer (Neilands, 1981). Il est produit et utilisé par la majorité des entérobactéries, telles que *Shigella*, *Salmonella* et *E. coli*. Il est intéressant de souligner que dans ce dernier groupe bactérien, la structure, la fonction et la régulation de ce type de système de transport sont similaires autant chez les souches pathogènes que chez les souches *E. coli* K-12 (non-pathogènes) (Payne et Mey, 2004).

##### 1.6.4.1.1 Le système de l'entérobactine et ses composantes

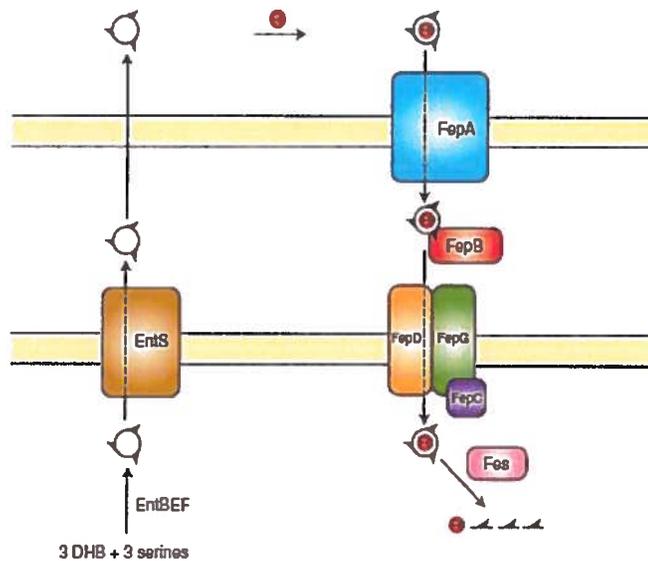
L'entérobactine est composée de trois groupes 2,3-dihydroxybenzoyl sérine (DHBS) unis par des liaisons ester (Payne et Mey, 2004). Le produit final est synthétisé dans le cytoplasme à partir d'une isomérisation du chorismate, un substrat cellulaire provenant du shikimate, suivie d'une série d'étapes enzymatiques (Liu *et al.*, 1990; He *et al.*, 2004) (Figure 1.4). Plus précisément, la biosynthèse de l'entérobactine et de ses dérivés est codée par l'opéron *entABCDEFGHI* situé sur le

chromosome bactérien (Payne *et al.*, 2006). La conversion du chorismate est initialement exécutée en trois étapes consécutives par les protéines enzymatiques EntC, EntB et EntA. Puis, la biosynthèse du sidérophore est finalisée par les protéines spécifiques EntD, EntE et EntF (Figure 1.4) (Walsh et Marshall, 2004).



**Figure 1.4 : Biosynthèse de l'entérobactine.**

Lorsque l'apport en fer intracellulaire diminue ou est insuffisant, la production du sidérophore est effectuée et, via la protéine membranaire EntS, sa sécrétion est permise vers le milieu extracellulaire d'où l'entérobactine peut lier le fer ferrique pour former ainsi le complexe ferri-entérobactine (Furrer *et al.*, 2002) (Figure 1.5). De plus, il a été démontré que chez la bactérie *E. coli* K-12, il existe une protéine de la membrane externe qui serait impliquée dans le transport de l'entérobactine : la protéine tunnel TolC (Bleuel *et al.*, 2005). Elle n'est toutefois pas un transporteur spécifique à ce sidérophore car elle est également impliquée dans les systèmes de résistance aux antibiotiques multiples et de macrolides en pompant les molécules à l'extérieur de la bactérie (Piddock, 2006). TolC permet aussi la sécrétion d'entérotoxines et l'importation de la colicine E1 (Masi *et al.*, 2007; Yamanaka *et al.*, 2008).



**Figure 1.5 : Mécanisme d'exportation de l'entérobactine et d'importation du complexe ferri-entérobactine chez *E. coli*.** L'entérobactine est représentée par une hélice et le complexe ferri-entérobactine est représenté par la spirale contenant l'ion ferrique (petit cercle rouge) (Fischbach *et al.*, 2006a).

Par la suite, le mécanisme permettant le transport du complexe ferri-entérobactine du milieu extracellulaire vers le cytoplasme bactérien est codé par les gènes de l'opéron *fepABCDEG*, également présents sur le chromosome bactérien (Ozenberger *et al.*, 1987). Ces gènes permettent la synthèse des constituants indispensables au système de transport, soit FepA, le principal récepteur protéique localisé sur la membrane externe, et FepB, la protéine périplasmique servant de navette jusqu'aux protéines transmembranaires FepCDG. Ces dernières forment ensuite le transporteur ABC localisé sur la membrane interne servant à livrer le complexe ferri-entérobactine dans le cytoplasme bactérien (Payne et Mey, 2004) (Figure 1.5). Arrivé ainsi à destination, le complexe est dégradé par l'estérase Fes afin de libérer le fer et le rendre énergétiquement utilisable par la bactérie (Winkelmann *et al.*, 1994). Il est important de souligner que FepA tire son énergie de la force proton-motrice générée par le complexe protéique transmembranaire TonB-ExbB-ExbD (non illustré dans la Figure 1.5). Ce dernier est donc aussi nécessaire à l'internalisation de

la ferri-entérobactine dans le périplasme bactérien (Letain et Postle, 1997; Higgs *et al.*, 2002). En bref, le système de l'entérobactine est exécuté grâce à quatre importants procédés protéiques soient de synthèse (EntABCDEF), de sécrétion (EntS, TolC), de transport (FepABCDG) et de dégradation (Fes).

#### 1.6.4.1.2 Le rôle de l'entérobactine dans la virulence bactérienne

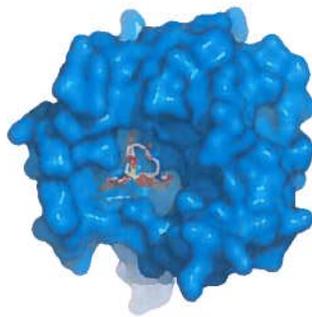
L'implication de l'entérobactine pour la virulence reste jusqu'à ce jour controversée. En effet, plusieurs études portant sur sa participation pour la pathogenèse bactérienne chez différentes espèces présentent des résultats différents ou contradictoires. Pour en citer quelques-unes, tout d'abord, des études transcriptomiques ont démontré que l'expression de gènes codant pour la production et le transport de sidérophores spécifiques, telle l'entérobactine, est surexprimée chez la souche UPEC CFT073 dans l'urine humaine par rapport au milieu riche LB, ainsi que chez la souche UPEC UT1189 lors d'une infection du tractus urinaire murin (Reigstad *et al.*, 2007; Snyder *et al.*, 2004). De plus, Benjamin et ses collaborateurs ont démontré que l'entérobactine, quoique nécessaire pour la croissance de *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium dans le sérum murin, n'était pas importante pour la virulence de la souche chez la souris (Benjamin *et al.*, 1985). Torres et ses collaborateurs ont également démontré que *E. coli* CFT073 mutée au niveau de la synthèse de l'entérobactine est toujours en mesure de coloniser et d'infecter le tractus urinaire murin, au niveau de la vessie et des reins (Torres *et al.*, 2001). Pourtant, il a été démontré que le système de sécrétion EntS contribue à la virulence de la souche ExPEC  $\chi$ 7122, dans un modèle d'infection aviaire, démontrant l'importance de la sécrétion des sidérophores de type catécholates pour la virulence. Cette sécrétion est aussi étroitement liée à la synthèse de l'entérobactine chez la souche ExPEC (Caza *et al.*, 2011).

En résumé, dans certains cas, l'entérobactine semble être un facteur de virulence qui contribue à la pathogenèse bactérienne tandis que dans d'autres situations, elle semble moins importante pour permettre une infection. Cette inefficacité pourrait s'expliquer par le fait que ce sidérophore est sujet à capture *in vivo* par le sidéocalin, une protéine immunitaire produite par l'hôte, empêchant ainsi

toute activité du sidérophore et son utilisation par la bactérie (Fischbach *et al.*, 2006a; Goetz *et al.*, 2002).

#### 1.6.4.1.3 Sidéocalin

Le sidéocalin (aussi nommé le NGAL (« *neutrophil-gelatinase-associated* ») ou le lipocalin) est une protéine de petite taille (25 kDa) qui participe à la défense immunitaire innée de l'hôte. Elle est présente chez plusieurs espèces telles que l'humain, la souris et le rat (Goetz *et al.*, 2002). Tout d'abord, elle est synthétisée par les précurseurs de neutrophiles matures, emmagasinée dans les granules spécifiques de ces derniers puis relâchée lors de leur activation (Kjeldsen *et al.*, 2000; Valdebenito *et al.*, 2007). En 2002, Goetz et ses collaborateurs ont fait une découverte très prometteuse. Suite à la cristallisation de la protéine, ils ont découvert que le sidéocalin séquestre fortement et spécifiquement l'entérobactine et ses dérivés (Goetz *et al.*, 2002) (Figure 1.6). De ce fait, l'implication de ce sidérophore dans la virulence *in vivo* a été davantage soulevée et étudiée.



**Figure 1.6: Structure du sidéocalin liant l'entérobactine** (Fischbach *et al.*, 2006a).

Des études ont par la suite démontré l'effet bactériostatique du sidéocalin chez la souris lorsque celle-ci était infectée par une souche *E. coli* qui n'exprimait que l'entérobactine. En revanche, cette souche non pathogène était en mesure de causer une infection chez des souris déficientes en sidéocalin (Flo *et al.*, 2004). Il va sans dire que la séquestration n'est permise qu'en raison de la structure chimique de

l'entérobactine. En effet, la création d'un encombrement stérique par l'ajout de glucose au sidérophore empêche sa séquestration par le sidérocaldin. Ainsi, la stratégie réside dans sa conformation structurale (Goetz *et al.*, 2002; Fischbach *et al.*, 2006b).

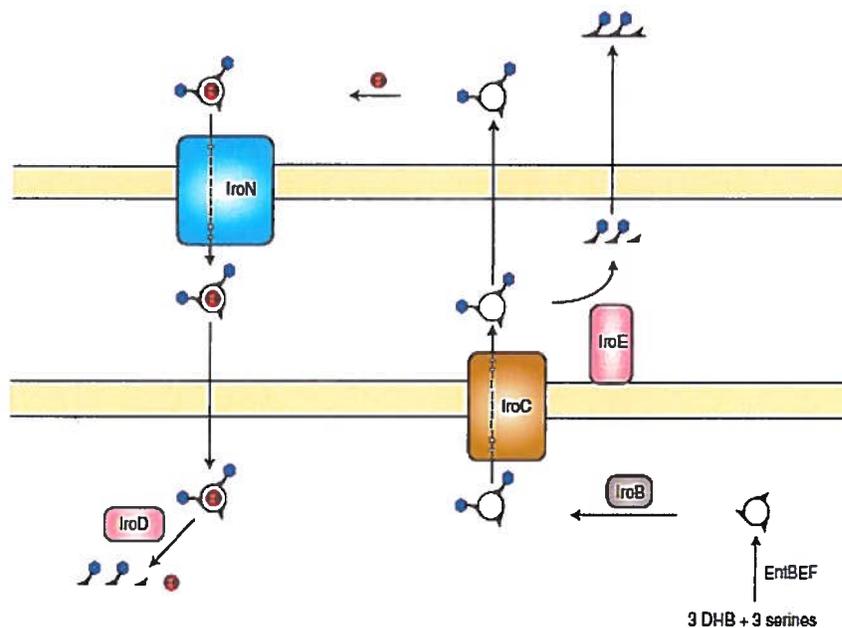
#### 1.6.4.2 Les salmochélines

Les salmochélines sont des sidérophores de type catécholate et qui possèdent une grande affinité pour le fer ferrique. Elles sont retrouvées chez plusieurs entérobactéries telles que *Salmonella*, *Klebsiella* et *E. coli* (Johnson *et al.*, 2000; Payne et Mey, 2004). Il existe sept composés de la famille des salmochélines, soient S4, le principal sidérophore, et ses dérivés SX, S0, S1, S2, S3 et S5. Leur synthèse dépend fortement de celle de l'entérobactine car S4 est le produit de la glycosylation d'un groupement principal de l'entérobactine (DHBS) (Bister *et al.*, 2004).

##### 1.6.4.2.1 Le système des salmochélines et ses composantes

Les salmochélines sont codées par les gènes *iroBCDEN*, appelés aussi locus *iroA*. Ce locus comprend en fait deux régions convergentes, soit un opéron *iroBCDE* ayant un promoteur en amont du gène *iroB* ainsi que le gène *iroN* dont le promoteur est indépendant (Baumler *et al.*, 1998). Le gène *iroB* code pour la glycosyl-transférase responsable de la conversion structurale de l'entérobactine en salmochélines par l'ajout de glucose (Fischbach *et al.*, 2005). En effet, il a été démontré que l'absence d'IroB inhibe la synthèse de salmochélines démontrant que cette enzyme est primordiale pour la glycosylation de DHBS (Bister *et al.*, 2004; Fischbach *et al.*, 2005). Lorsque l'apport en fer dans la bactérie est bas ou insuffisant, les gènes permettant la synthèse de l'entérobactine, et par ce fait des salmochélines, ainsi que leur transport cellulaire, sont activés. Ainsi, suite à la production de salmochélines par IroB, ces dernières sont possiblement sécrétées par la pompe à efflux IroC (Dozois *et al.*, 2003; Crouch *et al.*, 2008; Caza *et al.*, 2008) (Figure 1.7). Étant dans le milieu extracellulaire, les salmochélines sont en mesure de chélater le fer des ferroprotéines, puis le complexe formé est reconnu par le récepteur spécifique situé sur la membrane externe de la bactérie : IroN. La séquence protéique d'IroN est fortement homologue à celle du récepteur de l'entérobactine, et il est également dépendant de TonB. En effet,

il a été démontré qu'IroN est aussi capable d'internaliser l'entérobactine, ce qui fait de lui un récepteur très impliqué dans le transport ferrique des sidérophores de type catécholate (Payne et Mey, 2004). Les gènes *iroD* et *iroE* codent pour des estérases qui participent à la dégradation des salmochélines, et aussi de l'entérobactine, soit au niveau cytoplasmique et périplasmique, respectivement (Figure 1.7). Fes, bien qu'elle soit l'estérase endogène de l'entérobactine, participe aussi à l'hydrolyse de certaines formes de salmochélines (Lin *et al.*, 2005). Toutefois, malgré leur importance pour la linéarisation des sidérophores, aucune étude n'a démontré à ce jour un rôle potentiel de ces estérases pour la virulence bactérienne.



**Figure 1.7 : Mécanisme d'exportation des salmochélines et d'importation du complexe ferri-salmochéline chez *E. coli*.** La salmochéline est représentée par l'hélice avec deux cercles bleus et le complexe ferri-salmochéline est représenté par l'hélice contenant l'ion ferrique (petit cercle rouge). La synthèse intracellulaire des salmochélines est faite à partir de l'entérobactine par l'activité enzymatique d'IroB (Fischbach *et al.*, 2006a).

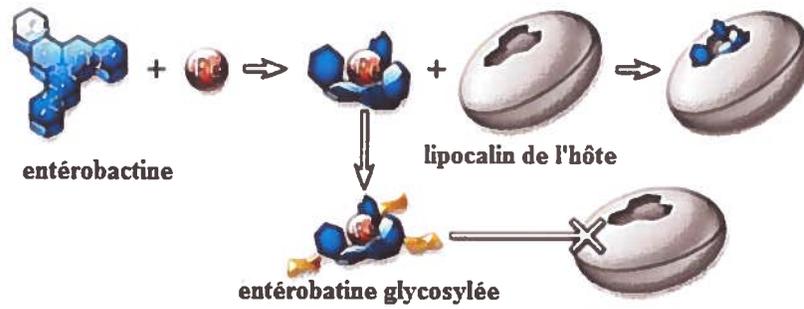
#### 1.6.4.2.2 Le rôle des salmochélines dans la virulence bactérienne

L'acquisition du fer nécessaire à la survie de la bactérie par les salmochélines est considérée comme un facteur de virulence. En effet, le locus *iroA* est retrouvé chez plusieurs entérobactéries pathogènes démontrant son importante utilisation pour établir une infection. Il a été identifié chez différents sérovars de *Salmonella enterica* et d'*E. coli* (Baumler *et al.*, 1998). Plus précisément, sa prévalence est plus grande chez les souches ExPEC que chez les souches intestinales (Russo *et al.*, 1999). Le locus *iroA* a été effectivement découvert chez plusieurs groupes de pathogènes extra-intestinaux tels que les UPEC, les NMEC et les APEC (Welch *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2002a; Bonacorsi *et al.*, 2000; Caza *et al.*, 2008). De ce fait, une étude a démontré le rôle du récepteur IroN pour la virulence de la souche uropathogène CP9. L'absence de ce gène chez la souche diminuait de façon significative sa capacité à coloniser la vessie et les reins comparativement à la souche sauvage lors d'une infection en compétition dans le modèle du tractus urinaire murin (Russo *et al.*, 2002). De plus, Crouch et ses collaborateurs ont démontré que les systèmes de synthèse et de transport (via IroC) des salmochélines chez *Salmonella enterica* sérovar Thyphimurium sont importants pour la virulence de la souche chez le modèle d'infection systémique de souris (Crouch *et al.*, 2008).

Negre et ses collaborateurs ont étudié l'importance du récepteur IroN dans la virulence d'une souche *E. coli* causant la méningite néonatale (NMEC). Ils ont découvert que les salmochélines, via leur récepteur IroN, sont le seul système d'acquisition de fer nécessaire à la souche pour causer une infection chez le modèle de méningite néonatale du rat (Negre *et al.*, 2004). De plus, une autre étude a démontré que la délétion du locus *iroA* chez la souche APEC  $\chi$ 7122 amenait à une diminution de sa capacité à infecter au niveau des poumons et de la rate de poulets dans un modèle d'infection systémique (Dozois *et al.*, 2003). Une autre étude intéressante a démontré que lorsque ce locus est introduit chez des souches *E. coli* non-pathogènes, la capacité à causer une infection et la persistance dans le sérum murin *in vivo* sont augmentées (Fischbach *et al.*, 2006b).

Tel que mentionné précédemment, les salmochélines sont le produit d'une modification structurale de l'entérobactine. L'ajout de glucose empêche donc la séquestration de ces sidérophores par le sidéocalin (lipocalin 2) (Figure 1.8). Une

étude a effectivement démontré que l'effet bactériostatique du sidéocalin est contrecarré par une souche *E. coli* non-pathogène à laquelle le locus *iroA* a été ajouté, lui conférant ainsi la capacité d'infecter, ce qu'elle est normalement incapable de faire (Goetz *et al.*, 2002; Fischbach *et al.*, 2006b; Wiles *et al.*, 2008).



**Figure 1.8 : Incapacité du lipocalin (sidéocalin) à lier les salmochélines.** L'ajout de glucose (flèches jaunes) à l'entérobactine produisant les salmochélines, empêche la liaison au lipocalin, contrairement à l'entérobactine (Wiles *et al.*, 2008).

En bref, les salmochélines sont considérées comme des facteurs de virulence chez les ExPEC tant à cause de leur conformité structurale que de leur rôle en tant que chélateurs de fer efficaces. De plus, la prévalence des gènes *iroBCDEN* codant pour ce système est grande chez les souches causant des infections du tractus urinaire (Johnson *et al.*, 2002a).

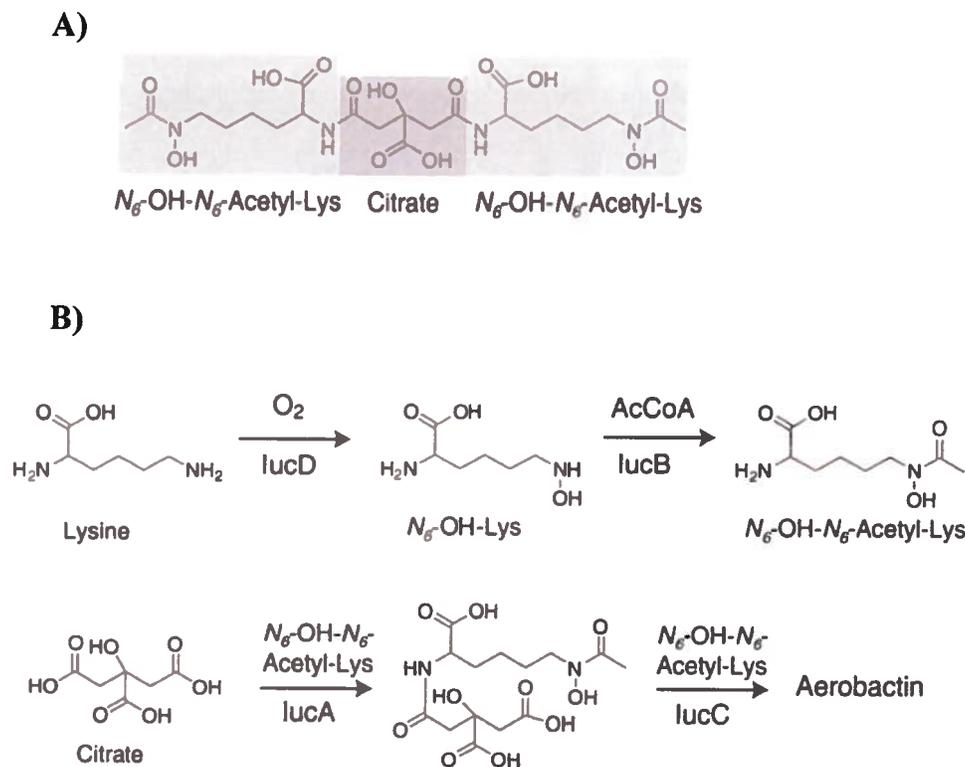
#### 1.6.4.3 L'aérobactine

L'aérobactine est un sidérophore de type « structure mixte » retrouvé chez plusieurs souches cliniques d'*E. coli* et *Salmonella*. Cette petite molécule, sécrétée par les bactéries, a la capacité de séquestrer le fer ferrique de l'hôte. Bien que l'aérobactine possède une constante d'affinité bien moindre que celle de l'entérobactine ( $10^{23}M^{-1}$ ), elle est plus stable et plus soluble (Williams et Carbonetti, 1986). De plus, contrairement aux sidérophores de type catécholate, elle possède une propriété énergétiquement avantageuse pour la bactérie qui la produit : elle est constamment recyclée et utilisée, sans avoir à subir une hydrolyse. De ce fait,

l'aérobactine n'a pas besoin d'être produite en grande quantité pour effectuer l'acquisition et le transport de fer de manière efficace et rapide (Montgomerie *et al.*, 1984; Williams et Carbonetti, 1986).

#### 1.6.4.3.1 Le système de l'aérobactine et ses composantes

Le système de l'aérobactine, incluant sa synthèse, son récepteur membranaire spécifique et son transport, est codé par deux opérons géniques. Tout d'abord, dans des conditions appropriées, la synthèse de l'aérobactine est activée via le locus *iucABCD* (de Lorenzo et Neilands, 1986). Celui-ci code pour des enzymes qui, à partir de la lysine et du citrate, catalysent les divers métabolites de la cascade réactionnelle afin de former le sidérophore (Figure 1.9).



**Figure 1.9 : Biosynthèse de l'aérobactine.** A) Structure de l'aérobactine. B) Étapes de synthèse de l'aérobactine à partir de la lysine, du citrate, de l'acétyl-CoA (AcCoA) et de l'oxygène par les enzymes du système *iuc* (Payne et Mey, 2004).

Suite à la sécrétion de l'aérobactine dans le milieu extracellulaire et à la chélation du fer nécessaire, le complexe ferri-aérobactine est reconnu par le récepteur de type ABC de la membrane externe de la bactérie, soit *lutA*, produit du gène *iutA*. Celui-ci fait partie du même opéron que celui de *iucABCD* (de Lorenzo et Neilands, 1986; Payne et Mey, 2004). Il est intéressant de mentionner que ce récepteur possède des séquences protéiques homologues aux récepteurs TonB dépendants, démontrant que l'internalisation du complexe nécessite l'énergie qu'il produit. Le transport à travers le périplasma jusqu'à la membrane interne s'effectue grâce aux protéines FhuB et FhuCD, produits des gènes faisant partie du deuxième opéron du système de l'aérobactine, soit *fhuBCD* (Koster et Braun, 1990). En effet, FhuD est une protéine périplasmique qui achemine le complexe, suite à son internalisation, vers le transporteur membranaire interne, soit FhuB, une perméase, et FhuC, une ATPase (Wooldridge *et al.*, 1992).

#### 1.6.4.3.2 Le rôle de l'aérobactine dans la virulence bactérienne

Les gènes de synthèse et celui du récepteur de l'aérobactine peuvent être retrouvés sur le plasmide de virulence pColV qui fait partie d'un groupe de plasmides présents chez plusieurs souches d'*E. coli* pathogènes. La présence de pColV chez ces souches est associée à la virulence en raison du fait que les gènes qu'il porte leur confèrent la capacité d'établir une infection (Williams, 1979). En revanche, la localisation des gènes codant pour le système de l'aérobactine est hautement variable entre les différents génomes et elle n'est donc pas réservée exclusivement aux plasmides pColV. En effet, ces gènes sont aussi retrouvés sur d'autres types de plasmides chez diverses entérobactéries (par exemple : *Salmonella*) (Williams et Warner, 1980; Payne et Mey, 2004). De plus, ils peuvent être localisés sur le chromosome bactérien chez quelques souches ExPEC (UPEC), EIEC et NMEC (Carbonetti *et al.*, 1986). Ainsi, la présence du système de l'aérobactine chez une multitude de bactéries pathogènes indique son importance dans la virulence. Pour citer quelques exemples, tout d'abord, des études ont démontré une corrélation entre la septicémie aviaire causée par les APEC et la présence du sidérophore (Delicato *et al.*, 2003; Dozois *et al.*, 1992). La délétion des gènes du système de l'aérobactine chez la souche APEC  $\chi$ 7122 diminuait sa capacité à infecter des poulets âgés de trois

semaines (Dozois *et al.*, 2003). De plus, l'aérobactine participe aussi à la virulence de la souche UPEC CFT073. En effet, dans un modèle d'infection du tractus urinaire ascendant murin en compétition, l'absence du récepteur lutA réduisait de manière significative la capacité de la souche à s'établir et à causer une infection, en comparaison à la souche sauvage (tableau 1.1; page 15). Par ailleurs, la perte cumulative des deux systèmes d'acquisition du fer, soit l'entérobactine et l'aérobactine, atténuait la souche UPEC CFT073 chez le modèle du tractus urinaire murin (Torres *et al.*, 2001).

#### 1.6.4.4 Yersiniabactine

Le sidérophore yersiniabactine a été originellement identifié chez le genre *Yersinia* et il est codé par les gènes *ybt* (Perry *et al.*, 1999). Ce genre regroupe plusieurs souches pathogènes humaines, qui sont responsables de diverses infections extra-intestinales. La yersiniabactine, produite chez ce genre, est de type phénolate qui s'apparente aux catécholates (Perry *et al.*, 1999; Miethke et Marahiel, 2007). Elle a la capacité de lier le fer ferrique contenu dans les ferroprotéines de l'hôte, telles que la transferrine et la lactoferrine (Perry, 2004). Le complexe yersiniabactine-Fe<sup>3+</sup> est transporté via une série de mécanismes impliquant le récepteur de la membrane externe, FyuA, et le système de translocation protéique TonB. La yersiniabactine est aussi synthétisée par une variété d'entérobactéries, particulièrement chez certains pathotypes (Clermont *et al.*, 2001). Chez ce groupe bactérien, les gènes responsables pour la synthèse et le transport de la yersiniabactine se trouvent sur une région nommée HPI pour « *high-pathogenicity island* », dont la régulation est dépendante du fer intracellulaire. Cette région est basée sur l'HPI de la souche originale *Y. pestis*, à laquelle elle est fortement homologue (Carniel, 1999). Elle a été ainsi identifiée chez différentes espèces telles que *Salmonella*, *Klebsiella* et *Enterobacter* (Bach *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2000; Zaharik *et al.*, 2002). Cette région a particulièrement été retrouvée chez divers pathotypes d'ExPEC isolés de sources sanguines et d'échantillons urinaires (Russo et Johnson, 2000; Johnson *et al.*, 2000; Schubert *et al.*, 2002). Ce HPI est donc considéré comme important pour la virulence de plusieurs espèces bactériennes. Le récepteur FyuA a aussi été récemment associé à la virulence

de la souche uropathogène *E. coli* VR50, attribuant à la yersiniabactine un rôle potentiel et probable dans le développement des ITUs (Hancock *et al.*, 2008).

### 1.6.5 L'entreposage du fer chez les bactéries

Le fer extracellulaire n'est pas l'unique source de fer disponible chez les bactéries. Plusieurs espèces bactériennes entreposent le fer intracellulaire grâce à des protéines synthétisées à cet effet (Andrews, 1998). Cette réserve peut ainsi être utilisée lorsque la biodisponibilité du fer extracellulaire est faible et pour prévenir l'accumulation excessive de fer libre dans le cytoplasme. Il existe trois catégories de protéines d'entreposage du fer dans le règne bactérien : la ferritine, la bacterioferritine et la protéine Dps. Ces trois familles peuvent être retrouvées au sein d'une même espèce et partagent plusieurs caractéristiques structurales et fonctionnelles. En effet, elles possèdent une architecture moléculaire particulière qui leurs procurent la capacité d'entreposer le fer. L'acquisition ferrique par les protéines d'entreposage se fait à partir du fer ferreux ( $Fe^{2+}$ ) intracellulaire qui est ensuite déposé dans la cavité centrale des protéines sous la forme oxydée ( $Fe^{3+}$ ). Ainsi, le processus de stockage du métal nécessite une étape de ferroxidation permettant la catalyse des protéines d'entreposage au niveau des sites spécifiques de liaison (Andrews *et al.*, 2003).

#### 1.6.5.1 Ferritine (FtnA)

La ferritine est composée de 24 sous-unités identiques. Elles forment une couche sphérique qui protège la cavité centrale logeant le réservoir ferrique de la protéine. La ferritine possède une masse d'environ 500 kDa, ce qui lui confère une dimension relativement grande pour accueillir 2000 à 3000 atomes d'ion ferrique. La ferritine est le produit du gène *fnA* situé sur le chromosome bactérien (Andrews *et al.*, 2003). Plusieurs études ont démontré que la FtnA permet d'entreposer le fer durant la phase de croissance post-exponentielle en présence d'un excès de fer libre. De ce fait, elle permet à la bactérie d'avoir une réserve de fer intracellulaire qui peut être utilisée par la bactérie lorsqu'elle sera exposée à des conditions limitantes en fer. Ainsi, *E. coli* mutée au niveau du gène *fnA* avait deux phénotypes distincts : une réduction de

moitié du contenu en fer intracellulaire lors de la phase de croissance stationnaire dans un milieu où le fer libre est suffisant, et une baisse de croissance bactérienne significative sous des conditions limitées en fer, reflétant un manque de réserve ferrique (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). Ces résultats démontrent donc que la ferritine joue un rôle important dans l'entreposage du fer.

#### 1.6.5.2 Bactérioferritine (Bfr)

La bactérioferritine possède relativement les mêmes caractéristiques structurales et fonctionnelles que la ferritine. Toutefois, chaque protéine possède douze groupes d'hème qui sont exposés à la surface interne de cavité protéique. La raison de leur présence est jusqu'à ce jour nébuleuse, mais il a été stipulé qu'ils ne sont pas nécessairement requis pour permettre l'entreposage ferrique (Andrews *et al.*, 2003). La bactérioferritine est codée par le gène *bfd*, qui fait partie de l'opéron *bfd-bfr*, où *bfd* code pour une ferredoxine ayant un groupement central [2Fe-2S]. Il a été proposé que Bfd régule le relâchement cellulaire de fer de la bactérioferritine. En effet, il semble que Bfd et Bfr interagissent de manière spécifique, lors de conditions limitantes en fer, afin de pouvoir relâcher le fer entreposé et de permettre à la bactérie de l'utiliser (Garg *et al.*, 1996; Quail *et al.*, 1996). Bfr ne semble toutefois pas jouer un rôle primordial dans l'entreposage du fer chez *E. coli*, car aucun phénotype au niveau du gène en question n'a été identifié chez la souche mutée.

#### 1.6.5.3 Dps

Les protéines Dps sont composées de 12 sous-unités identiques qui protègent le réservoir ferrique central. Elles sont plus petites et leur capacité de stockage est moindre que celle de la ferritine ou de la bactérioferritine. En effet, elles possèdent un poids d'environ 250 kDa et elles ont la capacité d'entreposer jusqu'à 500 atomes de fer par 12-mères (Andrews *et al.*, 2003). La première protéine Dps a été découverte chez l'espèce *E. coli*. Dps est reconnue pour être induite par le facteur de stress sigma ( $\sigma$ S) et ne possède pas de rôle spécifique (Almiron *et al.*, 1992). Toutefois, il a été démontré que chez la même espèce elle joue un rôle dans la protection contre le stress oxydatif, car elle participe à l'entreposage du fer (Zhao *et al.*, 2002).

## 1.7 Le stress oxydatif et le Fer

Le stress oxydatif est présent lorsqu'il y a une augmentation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ou une diminution de molécules anti-oxydantes. Il existe trois ROS qui, produites en grande quantité, engendrent un stress oxydatif : l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ), le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) et le radical hydroxyle ( $OH^*$ ). Le radical hydroxyle est le produit de toxicité par excellence et il est engendré à partir des deux premiers réactifs en présence de fer (section 1.5; page 18). Ces espèces réactives sont donc toxiques pour la cellule en raison de leur capacité à réagir fortement avec la majorité des composantes organiques telles que les membranes cellulaires, les protéines, les lipides ainsi que l'ADN (Storz et Zheng, 2000).

De plus, il est important de mentionner que ces ROS, autrement que par des perturbations environnementales externes, sont produites de façon naturelle par les organismes vivants lors du processus de respiration cellulaire, et par leurs cellules phagocytaires comme outil de défense contre les pathogènes (Griffiths, 1999). En effet, lors d'une infection, diverses cellules immunitaires de l'hôte, telles que les macrophages et les neutrophiles, sont activées afin de contrer les agents pathogènes. Elles possèdent des activités microbicides car elles ont la capacité de produire des ROS qui sont nuisibles pour plusieurs microorganismes (Storz et Zheng, 2000). Lors d'une ITU, la sévérité de l'infection systémique et le dommage aux tissus cellulaires dépendent de l'amplitude de la réponse inflammatoire provoquée par la colonisation des uropathogènes. Celle-ci dépend à son tour de la quantité de ROS extracellulaires produites par les cellules immunitaires. De ce fait, les bactéries pathogènes sont exposées en permanence au danger de toxicité oxydatif de l'environnement (Rama *et al.*, 2005). Somme toute, il n'est pas surprenant de constater que les organismes croissant en présence d'oxygène, dont les bactéries de type aérobie, ont su développer des mécanismes de résistance aux ROS ainsi que des systèmes de régulation au stress oxydatif.

### 1.7.1 Mécanismes de résistance bactérienne contre les ROS

Lors des premières étapes de colonisation bactérienne, la bactérie pathogène interagit avec l'épithélium de l'hôte avant d'être exposée aux cellules immunitaires.

L'épithélium, tel que celui de la vessie, a la capacité d'engendrer une diversité d'agents endogènes et exogènes dommageables pour l'ADN bactérien. Ainsi, mise à part les contraintes physiques du milieu, lors de l'initiation du processus infectieux, la bactérie pathogène est exposée à plusieurs dangers mortels qui la conduisent à activer sa réponse SOS (Li *et al.*, 2010). Cette réponse est dirigée par une diversité de régulateurs impliqués dans la réparation et/ou la tolérance aux dommages de l'ADN. Chez *E. coli*, il existe plus de 43 gènes impliqués dans ce mécanisme de défense, dont le système RecA/LexA régulé par *sulA* (Courcelle *et al.*, 2001; Friedberg *et al.*, 2006). Lors d'une infection causée par une bactérie pathogène (par exemple : une souche UPEC) la réponse SOS serait impliquée dans la défense du microorganisme et, de ce fait, contribuerait à la pathogénèse. Par ailleurs, l'adaptation du pathogène à différents radicaux oxydatifs, et ce durant la croissance cellulaire, est aussi un des mécanismes de protection contre les composantes du système immunitaire de l'hôte (Li *et al.*, 2010).

Tel que mentionné précédemment, la présence d' $O_2^-$  et d' $H_2O_2$  est détectée durant le métabolisme cellulaire de manière naturelle dans une diversité de systèmes biologiques. Cependant, leur conversion en présence de fer amène à la production du radical hydroxyle, l'agent toxique. Mise à part les systèmes de réparation de l'ADN, les bactéries, dont *E. coli*, ont de ce fait élaboré des systèmes enzymatiques hautement efficaces et spécifiques permettant d'éliminer ces deux intermédiaires réactifs le plus rapidement possible et ce, dès leur apparition. Parmi ces systèmes, il y a les superoxydes dismutases (SODs), les catalases et la glutathion peroxydase (Miller et Britigan, 1997; Griffiths, 1999).

### 1.7.1.1 Élimination de l'ion superoxide ( $O_2^-$ )

Tout d'abord, la SOD réduit la concentration d' $O_2^-$  en le convertissant en  $H_2O_2$  plus une molécule d'oxygène. Son rôle est donc de bloquer les réactions secondaires à la formation d' $OH^\bullet$ . Chez les bactéries, il existe deux classes de SOD cytoplasmiques soient SodA (qui utilise le manganèse comme cofacteur) et SodB (qui utilise le fer comme cofacteur) ainsi qu'un type de Sod périplasmique, soit SodC (qui utilise le cuivre et le zinc comme cofacteur) (Imlay et Imlay, 1996; Imlay, 2008). Un rôle dans la virulence chez les bactéries pathogènes, dont *Neisseria meningitidis* et *Salmonella typhimurium*, a été associé à ces métalloenzymes, et tout particulièrement à SodC. En effet, elles ont la capacité d'éliminer l'anion superoxyde, comme par exemple généré par les phagocytes lors d'une défense immunitaire, procurant ainsi au pathogène un mécanisme de défense contre le stress oxydatif (De Groote *et al.*, 1997; Wilks *et al.*, 1998).

### 1.7.1.2 Élimination du peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )

Le peroxyde d'hydrogène est plutôt éliminé par les peroxydases et les catalases. La principale peroxydase retrouvée chez *E. coli* est la peroxiredoxine AhpCF, une peroxydase NADH à deux composantes, originellement identifiée chez *S. typhimurium* (Christman *et al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1986; Zheng *et al.*, 2001). La majorité des organismes possèdent aussi des catalases qui détoxifient cette ROS et qui sont codées par les gènes *kat*. Chez *E. coli*, deux isoenzymes sont présentes soient HPI, codée par le gène *katG*, et HPII, codée par les gènes *katE* et *katF* (Schellhorn, 1995). Par ailleurs, Zhao et ses collaborateurs ont démontré que la protéine de stockage Dps retrouvée chez *E. coli* a la capacité de séquestrer le peroxyde d'hydrogène, lui suggérant ainsi un rôle primordial dans la protection contre les dommages oxydatifs (section 1.6.5.3) (Zhao *et al.*, 2002).

Les dommages causés par les ROS chez diverses bactéries telles qu'*E. coli* (et chez les cellules eucaryotes) peuvent être contrecarrés par la présence de chélateurs d'ions métalliques (Andrews *et al.*, 2003). Ceci minimiserait le potentiel de toxicité de ce métal en limitant sa disponibilité et, donc aussi, sa participation aux diverses réactions oxydatives. De plus, à l'exception du système d'endonucléases (APIV), la

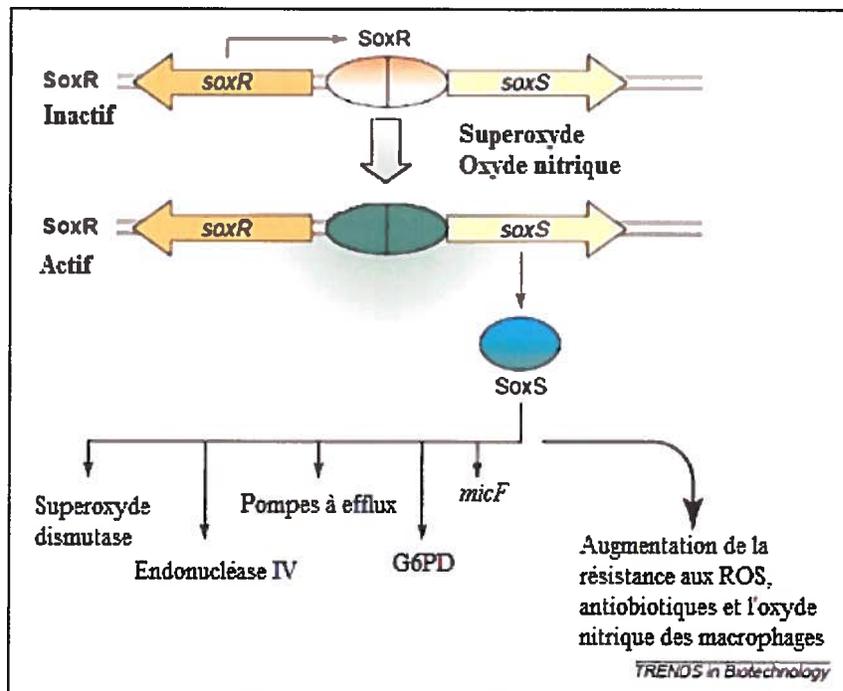
majorité des gènes induits par les dommages oxydatifs amènent plutôt à la prévention qu'à la réparation directe de l'ADN ou d'autres composantes cellulaires. Leur régulation spécifique est donc importante pour le bon fonctionnement de leur activité préventive anti-oxydative (Asad *et al.*, 2004).

## 1.7.2 Systèmes de régulation au stress oxydatif

Chez *E. coli*, ils existent deux grands systèmes de régulation de stress oxydatif ayant des fonctions distinctes : SoxRS et OxyR.

### 1.7.2.1 SoxRS

Le système SoxRS agit en deux étapes. Tout d'abord, la petite protéine senseur SoxR est activée lorsqu'elle est oxydée au niveau de ses groupements centraux [2Fe-2S] par l'O<sub>2</sub><sup>-</sup> ou l'oxyde nitrique (Storz et Imlay, 1999). Sous la forme oxydée, la protéine SoxR est en mesure d'induire la transcription de *soxS*, le régulateur positif du système (Figure 1.10). Dans un deuxième temps, la protéine SoxS stimule différents mécanismes de défense contre l'anion superoxyde, et ce, en activant la transcription de divers gènes qui y sont impliqués (Wu et Weiss, 1992; Hidalgo *et al.*, 1995) (Figure 1.10). Il existe ainsi plusieurs produits qui sont induits par le régulon *soxRS* dont la superoxyde dismutase-Mn (*sodA*), l'endonucléase IV (*nfo*), la glucose-6-phosphate déhydrogénase (*zwf*), l'acotinase (*acnA*), la fumarase (*fumC*), la pompe à efflux d'antibiotiques et de toxines (*acrAB*), la flavodoxine (*fldA*) et la protéine Fur, répresseur des systèmes d'acquisition de fer (*fur*) (Figure 1.10) (Amabile-Cuevas et Demple, 1991; Gaudu *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1999; Pomposiello et Demple, 2001).



**Figure 1. 10 : Le régulon SoxRS.** SoxR est produite constitutivement. Suite à son activation par l'anion superoxyde ou l'oxyde nitrique, la protéine SoxR active la transcription de *saxS*. Une fois produite, SoxS peut activer la transcription d'une panoplie de gènes impliqués dans les mécanismes de survie et de résistance bactérienne (Pomposiello et Demple, 2001).

### 1.7.2.2 OxyR

Le système OxyR se spécialise davantage dans la défense contre le peroxyde d'hydrogène. Il est principalement composé de la petite protéine OxyR. Sa transcription est activée par l' $H_2O_2$  via l'oxydation de deux de ses résidus cystéines. Sous la forme d'un tétramère actif, OxyR est en mesure d'activer la transcription de gènes codant pour une diversité de protéines anti-oxydantes, dont les catalases et les alkylhydroperoxides réductases, et de gènes impliqués dans l'homéostasie du fer (Storz *et al.*, 1990; Pomposiello et Demple, 2001). Une synthèse des différents régulons activés directement par OxyR chez *E. coli* est détaillée dans le Tableau 1.2.

**Tableau 1.2 : Régulons activés par le système OxyR- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, chez *Escherichia coli* (Adapté d'Imlay, 2008)**

Rôles	Système(s) régulé(s) par OxyR
Capture d' H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	AhpCF
	Catalase G
Synthèse de l'hème	Ferrochelatase
Assemblage des centres Fer-Soufre	SufABCDE
Capture de fer	Dps
Contrôle de l'importation ferrique	Fur
Importation des cations divalents	MntH
Réduction disulfide	Thioredoxin C
	Glutaredoxine A
	Glutathione reductase
	Dsbg (réductase périplasmique)
Fonction inconnue	Plusieurs

De plus, OxyR active la transcription du gène *oxyS* qui code pour un petit ARN non codant : OxyS. Ce dernier a un rôle protecteur contre la mutagenèse via la régulation de plus de 20 gènes impliqués dans l'intégration de la réponse au peroxyde d'hydrogène (Altuvia *et al.*, 1997; Zhang *et al.*, 1997). En d'autres mots, il coordonne la réponse cellulaire au stress oxydatif.

Ainsi, l'implication du système OxyR est importante pour la défense contre les ROS produites soit par l'hôte ou par la bactérie elle-même. La régulation de ce mécanisme est aussi importante pour les bactéries inoffensives que pour les pathogènes. En effet, il a été démontré que ce système est requis pour la virulence d'une souche UPEC dans un modèle d'infection du tractus urinaire murin. La présence d'une réponse au stress oxydatif durant l'infection met en évidence que l'attachement des UPEC à l'uro-épithélium provoque le recrutement de neutrophiles

(Johnson *et al.*, 2006). De plus, OxyR agirait de concert avec une méthyl-transférase afin de réguler l'expression de l'auto-transporteur Ag43 impliqué dans l'agrégation, la formation de biofilm et la persistance à long terme des UPEC dans la vessie (Haagmans et van der Woude, 2000; Ulett *et al.*, 2007; Wells *et al.*, 2007).

## 1.8 Régulateurs de l'homéostasie du fer

La régulation globale des mécanismes assurant l'homéostasie du fer chez la bactérie est primordiale, car elle lui permet de maintenir un apport en fer suffisant pour sa survie tout en contrôlant le potentiel de toxicité de ce métal. De ce fait, les bactéries sont dotées de régulateurs qui assurent le bon fonctionnement des systèmes contrôlant l'acquisition et l'entreposage du fer ainsi que la prévention contre un danger oxydatif. Chez la bactérie *E. coli*, il existe plusieurs régulateurs assurant ces rôles dont deux qui se distinguent tant au niveau de leur mécanisme d'action qu'au niveau de leur méthode de régulation complémentaire. Ces régulateurs sont la protéine Fur («*ferric uptake regulator*») et le petit ARN non codant, RyhB (Masse et Gottesman, 2002; Andrews *et al.*, 2003).

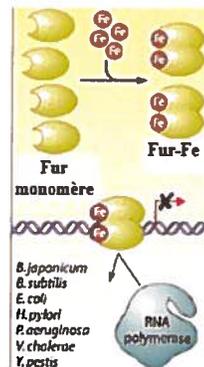
### 1.8.1 La protéine Fur

Fur est présente chez la majorité des bactéries Gram négatives et positives, faisant d'elle une protéine conservée dans le règne bactérien. En fait, Fur est une protéine homodimère, d'environ 15 à 17 kDa, qui interagit de manière réversible avec des séquences ciblées du génome, et ce, dépendamment de la présence de  $Fe^{2+}$  intracellulaire (Hantke, 2001). En effet, en plus d'augmenter de plus de 1000 fois l'affinité de Fur pour les sites d'ADN ciblés, la liaison d'un ion ferreux à chaque sous-unité de la protéine permet son activation, faisant de ce métal son corépresseur (Coy et Neilands, 1991; Andrews *et al.*, 2003). Il a été démontré que Fur a aussi la capacité de lier d'autres métaux chimiquement apparentés au fer, tels que le cobalt ( $Co^{2+}$ ) et le manganèse ( $Mn^{2+}$ ). Toutefois, leur interaction avec la protéine Fur est physiologiquement insignifiante en raison du fait qu'ils y sont présents en quantité insuffisante (Bagg et Neilands, 1987). Lors de la phase exponentielle de croissance, la protéine Fur est très abondante, allant jusqu'à 5000 copies par cellule. Par ailleurs, ce

taux élevé est similairement retrouvé chez la bactérie gram négatif *Vibrio cholerae*, agent causant le choléra. Il a été suggéré que cette abondance est due soit au fait que Fur régule l'expression de plusieurs gènes ou qu'il peut agir comme réserve de fer disponible dans la cellule (Watnick *et al.*, 1997; Zheng *et al.*, 1999).

### 1.8.1.1 Mécanisme de régulation

Chez *E. coli*, la protéine Fur est constituée d'au moins un ion de zinc par dimère, situé sur un site spécifique. Il a été récemment démontré que ce site avait un rôle potentiel dans la dimérisation de la protéine et qu'il est essentiel pour la stabilisation de la structure protéique (Pecqueur *et al.*, 2006; D'Autreaux *et al.*, 2007). De plus, les sous-unités de Fur sont constituées de deux domaines importants soient le domaine N-terminal, qui permet la liaison à l'ADN, et le domaine C-terminal, qui lie le  $Fe^{2+}$  et qui assure la dimérisation de la protéine (Stojiljkovic et Hantke, 1995). Suite à la formation du complexe Fur- $Fe^{2+}$ , celui-ci a la capacité de lier une séquence consensus de l'ADN situé en amont du gène régulé, nommé la boîte Fur (Fur box). De ce fait la transcription du gène est inhibée, car l'accès à l'ARN polymérase est bloqué par le complexe (Figure 1.11). Cette boîte se situe normalement entre les sites -35 et -10 pb de la région promotrice du gène régulé et elle est composée de trois ou quatre hexamères répétitifs et imparfaits de GATTAT permettant la liaison du complexe dimérique (Lavrrar et McIntosh, 2003; Andrews *et al.*, 2003). Le complexe Fur- $Fe^{2+}$  possède donc la conformation nécessaire pour interagir avec la boîte Fur et, ainsi, permettre une répression positive des gènes ciblés.

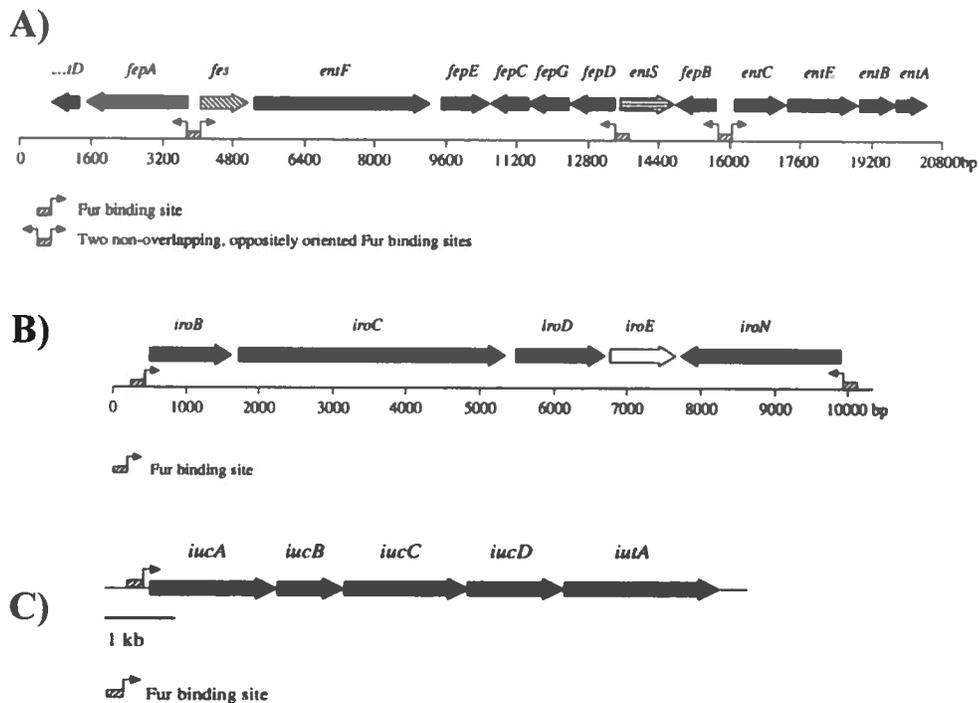


**Figure 1.11 : Mécanisme de régulation négative de la protéine Fur chez diverses bactéries Gram négatives (Carpenter *et al.*, 2009).**

Fur est un régulateur transcriptionnel qui contrôle l'expression d'une diversité de gènes, dont son propre gène (*fur*). Ceci fait donc de lui un régulateur global. Généralement, il agit comme un répresseur positif, mais dans certains cas, il peut agir en tant qu'inducteur de gènes essentiels (Andrews *et al.*, 2003). La régulation positive et indirecte de Fur sur plusieurs gènes est en partie expliquée par son interaction avec un régulateur post-transcriptionnel, le petit ARN non-codant RyhB (section 1.8.2.1). Chez *E. coli*, Fur régule l'expression de plus de 90 gènes impliqués dans les mécanismes de développement du métabolisme bactérien, tels que la glycolyse (*gpmA*), le cycle de TCA (*sdhCDAB*) et la respiration cellulaire (*cyoA*). Par ailleurs, il régule principalement les gènes impliqués dans la régulation de l'homéostasie du fer (Andrews *et al.*, 2003; McHugh *et al.*, 2003; Carpenter *et al.*, 2009).

#### 1.8.1.2 Fur et l'acquisition du fer

La principale fonction physiologique de la protéine Fur est de réprimer les gènes impliqués dans l'acquisition du fer. Diverses études chez plusieurs entérobactéries, telles que *E. coli*, *Salmonella* et *Neisseria*, ont amené à identifier les gènes qu'il régule, soit par la découverte d'une boîte Fur en amont de la séquence ciblée ou par la présence d'une régulation indirecte de la protéine (Carpenter *et al.*, 2009). Parmi ces cibles, il y a entre autres les gènes codant pour les sidérophores, un des systèmes d'acquisition du fer les plus utilisés par les bactéries (Figure 1.12). Tout d'abord, Fur réprime l'expression des composants essentiels des systèmes de transport des catécholates, dont l'entérobactine et les salmochélines. En effet, Fur affecte la synthèse, le transport et la dégradation de l'entérobactine en régulant négativement au niveau de trois régions chromosomiques du système (Figure 1.12 A). De plus, il régule négativement l'expression du récepteur des salmochélines, IroN, ainsi que celui de la glycosyl-transférase responsable de la synthèse du sidérophore, IroB (Figure 1.12 B) (Brickman *et al.*, 1990; Hunt *et al.*, 1994; Baumler *et al.*, 1998). Les gènes codant pour la synthèse et le transport de l'aérobactine, soit respectivement *iucABCD* et *iutA*, sont aussi sous le contrôle négatif de Fur chez *E. coli* (Figure 1.12 C) (de Lorenzo *et al.*, 1987).



**Figure 1.12 : Organisation chromosomique des sidérophores chez *E. coli*.** La régulation négative par Fur (site de liaison = petite boîte hachurée) des systèmes de A) l'entérobactine, B) des salmochélines et C) de l'aérobactine (Payne et Mey, 2004).

Outre cela, il existe d'autres gènes étroitement liés à l'acquisition du fer et qui sont aussi réprimés par Fur chez *E. coli*. Il y a ainsi les récepteurs de sidérophores FhuA (ferrichrome) et Cir (colicine I), le système de transport du citrate ferrique, FecABCDE, l'adhésine/récepteur de catécholates, Iha, et le transporteur de métaux ( $\text{Fe}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ ) SitABCD (Patzer et Hantke, 2001; Carpenter *et al.*, 2009).

En résumé, lorsque la concentration intracellulaire de fer atteint un seuil de suffisance ou d'excédant, la protéine Fur est activée en présence de son co-répresseur, le fer ferreux. Le complexe dimérique actif est ainsi en mesure d'inhiber l'expression des gènes impliqués dans la synthèse et/ou dans le transport des systèmes d'acquisition du fer (par exemple : les sidérophores), empêchant ainsi toute acquisition supplémentaire de fer dans le cytoplasme bactérien. De ce fait, il prévient l'accumulation excessive du métal qui peut être potentiellement toxique pour la bactérie aérobie. Lorsque la concentration intracellulaire en fer diminue ou se rétablit,

Fur est inactivé, dû à un approvisionnement limité de son co-facteur. Ceci permet la réactivation des gènes impliqués dans l'acquisition du fer (Andrews *et al.*, 2003; de Lorenzo *et al.*, 2004). Tel que mentionné précédemment, le fer est un métal très important pour la survie de la majorité des microorganismes. Ainsi, la régulation de son acquisition par Fur joue un rôle primordial chez diverses bactéries qui l'utilise, et ce, probablement même durant un processus infectieux (par exemple : une ITU).

### 1.8.1.3 Fur et le stress oxydatif (fer)

Le gène *fur* chez *E. coli* fait partie de l'opéron *fldA-fur*, situé sur le chromosome bactérien. Cet arrangement génique est aussi retrouvé chez plusieurs autres espèces bactériennes telles que *Yersinia pestis* et *Klebsiella pneumoniae* (Zheng *et al.*, 1999). Le gène *fldA* code pour une protéine essentielle, la flavodoxine, qui est impliquée dans la défense contre le stress oxydatif (section 1.7.2; page 40) (Andrews *et al.*, 2003). En effet, il a été démontré que la flavine (composée de la flavodoxine) est le médiateur responsable de la réduction ferrique durant un stress oxydatif, *in vivo*. Ainsi, il est possible que la flavodoxine joue un rôle important dans le maintien du fer cytoplasmique dans un état réduit (fer ferreux) afin que la protéine Fur puisse s'en servir comme co-facteur (Woodmansee et Imlay, 2002; Andrews *et al.*, 2003). Une relation entre les deux protéines serait ainsi en place afin de prévenir un stress oxydatif.

De plus, il a été démontré que l'opéron *fldA-fur* est induit par le système de régulation SoxRS en réponse au stress causé par l'anion superoxyde (section 1.7.2.1; page 40) (Zheng *et al.*, 1999; de Lorenzo *et al.*, 2004). Fur lui-même joue un rôle dans la protection contre l'ion superoxyde. En effet, il a été démontré que Fur régule les gènes *sod* codant pour les superoxydes dismutases (SODs). Plus précisément, lorsque l'apport en fer est élevé dans la cellule, le complexe Fur-Fe<sup>2+</sup> réprime directement *sodA*, gène codant pour la SOD-Mn<sup>2+</sup> chez *E. coli* (Niederhoffer *et al.*, 1990). En revanche, la superoxyde dismutase SodB (*sodB*) est indirectement et positivement régulée par Fur. De ce fait, les gènes *sodA* et *sodB* sont réciproquement régulés par la protéine Fur en réponse au fer, lui permettant ainsi de participer à la défense contre le stress oxydatif (section 1.7.2; page 40) (Dubrac et Touati, 2000; Masse et Gottesman, 2002). Zheng et ses collaborateurs ont découvert que le gène *fur* a aussi son propre

promoteur inductible par le régulateur de stress hydroxyle, OxyR (section 1.7.2.2; page 41). Ainsi, en présence d'agents réactifs à l'oxygène, les régulateurs principaux du stress oxydatif, SoxRS et OxyR, sont activés, permettant la mise en marche d'une série de mécanismes de défense incluant le régulateur global Fur (Zheng *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2003).

Cette régulation croisée révèle un lien important entre la régulation du stress oxydatif et celle de l'homéostasie du fer. Lorsque Fur est produit en grande quantité, celui-ci serait en mesure de lier le fer ferreux présent dans le cytoplasme bactérien, d'inhiber les systèmes d'acquisition de fer et d'induire l'entreposage ferrique. De ce fait, une diminution de la quantité de fer libre intracellulaire aurait pour effet de prévenir la toxicité liée à ce métal et de protéger la bactérie contre les dommages oxydatifs (Andrews *et al.*, 2003). En effet, Touati et ses collaborateurs ont démontré que l'inactivation du gène *fur* chez *E. coli* augmentait la sensibilité de la bactérie au stress oxydatif *in vitro*, en raison d'une dérégulation du métabolisme ferrique. Par ailleurs, l'effet drastique peut être compensé par l'ajout de chélateurs de fer (diminution du fer libre), par la mutation du gène *tonB* (inhibition de transport ferrique) ou par une surexpression du gène de la ferritine (*fimA*), protéine d'entreposage de fer (section 1.6.5; page 35) (Touati *et al.*, 1995; Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). La sensibilité du mutant *E. coli* peut ainsi se traduire par le fait que l'absence de Fur a une conséquence directe sur l'augmentation de la quantité de fer libre dans le cytoplasme bactérien, soit en permettant une expression constitutive des systèmes d'acquisition de fer et une faible biodisponibilité pour les protéines d'entreposage (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2003).

De plus, il a été démontré que chez plusieurs bactéries telles que *Yersinia pestis*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* et *E. coli*, les gènes *kat*, codant pour les hydroperoxydases HPI et HPII, sont régulés positivement par Fur (Carpenter *et al.*, 2009). Ainsi, *E. coli* mutée au niveau de *fur* est plus sensible aux dommages oxydatifs causés par les irradiations UVA, car la sous-expression de *kat* amène à une diminution de la production des iso-enzymes responsables de la détoxification (Hoerter *et al.*, 2005). Ceci démontre encore une fois l'importance de la régulation de l'homéostasie du fer par la protéine Fur pour la survie d'une diversité d'espèces bactériennes vivant en présence d'oxygène.

#### 1.8.1.4 Rôles de Fur dans la virulence bactérienne

Diverses études ont mis en évidence le rôle de Fur dans la pathogénèse bactérienne. En effet, en plus de son implication primordiale dans l'homéostasie du fer, il peut être directement impliqué dans la colonisation et dans la virulence des bactéries (Carpenter *et al.*, 2009). Tout d'abord, la mutation *fur* exécutée chez diverses souches pathogènes, telles que *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* et *Campylobacter jejuni* a démontré une baisse dans leur capacité à coloniser et à causer une infection dans un modèle animal approprié (Horsburgh *et al.*, 2001; Palyada *et al.*, 2004; Rea *et al.*, 2004). En plus de jouer un rôle dans la colonisation, Fur régule plusieurs autres gènes codant pour des facteurs de virulence. Parmi ces derniers, il y a ceux impliqués dans la formation de biofilm chez *P. aeruginosa* ainsi que dans la production de protectines chez *N. meningitidis*, de l'hémolysine chez *V. cholerae*, de l'adhésine/récepteur de catécholates, Iha, chez les UPEC, et de toxines-Shiga chez les EHEC (Calderwood et Mekalanos, 1987; Stoebner et Payne, 1988; Ochsner *et al.*, 1995; Grifantini *et al.*, 2003; Rashid *et al.*, 2006). Chez les ETEC, il a aussi été démontré que Fur joue un rôle dans l'adhésion bactérienne en réprimant l'expression de fimbriae CFA/I (Karjalainen *et al.*, 1991).

De plus, Fur participe à la régulation de plusieurs mécanismes liés à la virulence et qui sont nécessaires à la survie de l'espèce. Tel que mentionné précédemment, il est un régulateur important de la réponse au stress oxydatif et ce chez plusieurs bactéries. Cette régulation est primordiale lors du processus infectieux, car les pathogènes sont confrontés à une multitude d'agents oxydatifs pouvant compromettre leur fonction. De plus, Fur régule divers gènes impliqués dans la réponse de résistance à l'acide (Carpenter *et al.*, 2009). En effet, il a été démontré que Fur, indépendamment de la biodisponibilité en fer, participe à la réponse de la tolérance acide (ATR) de *S. enterica* sérovar Typhimurium *in vivo* (Foster, 1991; Hall et Foster, 1996). Pour certaines espèces pathogènes, telle que *Salmonella*, cette caractéristique est très importante pour sa survie car l'espèce pathogène doit constamment combattre le stress d'acidité engendré par les cellules immunitaires de l'hôte et le faible pH que présente le lieu d'infection, soit le tractus intestinal (Carpenter *et al.*, 2009). De plus, en combinaison avec d'autres activateurs, Fur régule le système de sécrétion de type III retrouvé sur l'îlot de pathogénicité 1 de *S. enterica* sérovar Typhimurium, responsable de l'invasion de la souche dans les cellules

épithéliales de l'hôte (Ellermeier et Slauch, 2008). Par ailleurs, la régulation par Fur au niveau des systèmes d'acquisition du fer impliqués dans la virulence, tels que les salmochélines et l'aérobactine, fait aussi de lui un candidat possiblement influant sur la pathogenèse de diverses souches qui exploitent ces systèmes (par exemple : ExPEC).

La régulation par Fur de plusieurs gènes de virulence retrouvés chez une diversité d'espèces bactériennes, démontre donc qu'il joue un rôle important dans la pathogenèse, dépendamment ou indépendamment des mécanismes ferriques.

### **1.8.2 RyhB, un petit ARN non-codant**

Les petits ARN non-codants (ARNnc) sont retrouvés chez tous les microorganismes, principalement en tant que régulateurs traductionnels et stabilisateurs de messages cellulaires. Globalement, il existe trois principales caractéristiques qui définissent les régulateurs ARNnc (Gottesman, 2004) :

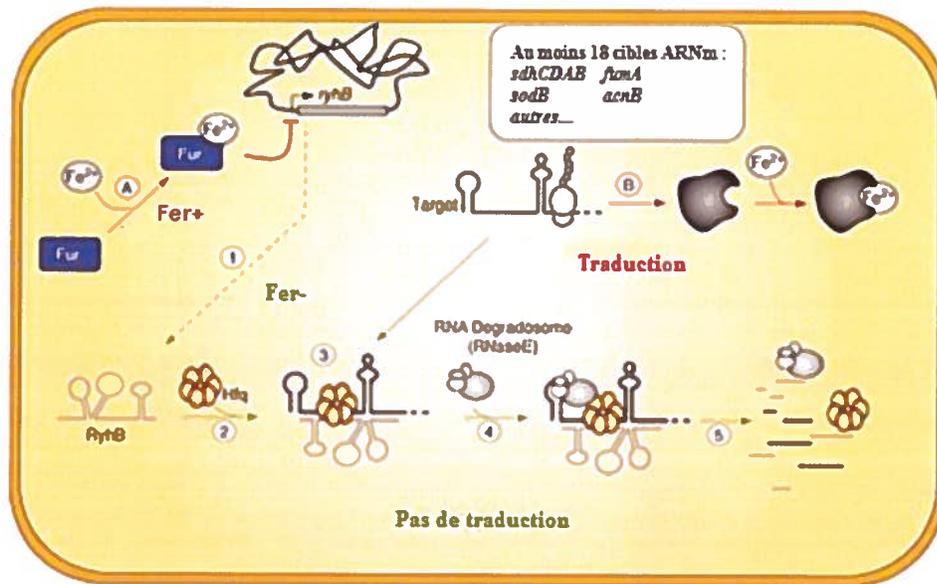
1. Leur synthèse et leur activation sont permises que sous des conditions spécifiques (par exemple : carence en fer).
2. Leur mode d'action est spécifique; la spécificité est procurée tant par la structure que par la séquence de l'ARN ciblé.
3. Leur temps d'action est limité; la réponse est très rapide.

Chez la bactérie *E. coli*, plus de 50 ARNnc ont été identifiés et sont impliqués dans plusieurs mécanismes cellulaires. Il existe un groupe particulier d'ARNnc qui utilise la chaperonne Hfq, une protéine nécessaire à l'appariement des ARNnc aux ARNm cibles et à l'exécution de la régulation post-transcriptionnelle. Parmi ce groupe, il y a entre autres OxyS, qui coordonne la réponse cellulaire au stress oxydatif (tableau 1.2; page 42) et RyhB qui joue un rôle central dans l'homéostasie du fer (Gottesman, 2004).

### 1.8.2.1 Mécanisme de régulation

Des études génomiques servant à trouver des gènes codant pour des ARNnc chez *E. coli* K-12 ont permis d'identifier un petit ARNnc composé de 90 nucléotides : RyhB (Argaman *et al.*, 2001; Wassarman *et al.*, 2001). Il a comme fonction d'inhiber la transcription des ARNm cibles en promouvant leur dégradation. Cette régulation post-transcriptionnelle débute par un appariement antisens spécifique de RyhB à l'ARNm ciblé. La chaperonne Hfq qui s'y lie assure l'interaction spécifique et la stabilité de l'ARNnc. Suite à cela, le complexe de dégradosomes d'ARN (RNaseE) est recruté et une co-dégradation rapide de l'ARNm avec le petit ARNnc s'ensuit (Masse et Gottesman, 2002; Masse *et al.*, 2003) (Figure 1.13). Lors d'une carence en fer, les ARNm principalement ciblés par RyhB sont ceux codant pour des protéines d'entreposage du fer et non-essentiels. Ainsi, ce mécanisme d'action (la co-dégradation) permet une réponse spécifique et très rapide due à l'inactivation presque immédiate de l'ARNnc avec le transcrite. Chez *E. coli*, ce type de système est aussi utilisé par d'autres ARNnc, tels que OxyS et DsrA (Masse *et al.*, 2007).

Une récente approche ARNnomique a permis de démontrer que RyhB régule une diversité de transcrits de manière directe et indirecte. Plus précisément, lors de conditions de carence en fer, RyhB réprime plus de 18 transcrits, codant pour 56 protéines, dont la majorité est impliquée dans l'homéostasie du fer (Masse *et al.*, 2005). Parmi ces transcrits, il y a particulièrement les gènes qui sont régulés positivement par Fur, soient *acnA*, *fumA* et *sdhCDAB* (enzymes ferriques du cycle TCA), *ftnA* et *bfr* (ferritine et bacterioferritine) ainsi que *sodB* (superoxyde dismutase ferrique) (section 1.8.1.1; page 44). Cette interaction s'explique par la présence d'une boîte Fur dans le promoteur du gène *ryhB*, démontrant que Fur est un répresseur de RyhB (Masse et Gottesman, 2002) (Figure 1.13). De ce fait, la régulation indirecte et positive de ces gènes par Fur lors de conditions riches en fer se traduit, en fait par une répression du gène *ryhB*, empêchant ainsi sa synthèse et, par conséquent, la dégradation des transcrits par le petit ARNnc. Il est à noter toutefois que seule l'activation directe de *ftnA* par Fur a été à ce jour explicitée (Masse et Gottesman, 2002; Nandal *et al.*, 2010).



**Figure 1.13 : Mécanisme de régulation par RyhB en relation avec Fur chez *E. coli* K-12.** Les flèches rouges représentent les conditions suffisantes en fer et les flèches vertes, les conditions de carence en fer intracellulaire (Masse *et al.*, 2007).

Une relation très importante au niveau de l'homéostasie du fer a été démontrée chez diverses espèces bactériennes entre le régulateur Fur et le petit ARNnc RyhB. Un des mécanismes les plus connus à ce jour est celui retrouvé chez *E. coli* K-12 (Figure 1.14). Tel que mentionné précédemment, lorsque la concentration intracellulaire en fer est suffisante ou élevée, Fur est activé en présence de son cofacteur le fer ferreux. De ce fait, le complexe activé, en réprimant la synthèse de RyhB, peut inhiber une diversité de gènes impliqués dans l'acquisition du fer et indirectement en activer d'autres impliqués dans l'entreposage du fer (Hantke, 2001; Masse et Gottesman, 2002). En effet, RyhB cible des gènes codant pour des protéines d'entreposage du fer et les protéines ferriques non-essentiels. Somme toute, Fur empêche l'acquisition du fer et permet son entreposage afin de prévenir son accumulation. Lorsque la concentration intracellulaire en fer se rétablit, Fur est inactivé, permettant au gène *ryhB* d'être exprimé et de synthétiser l'ARNnc. Ce dernier peut donc cibler les ARNm codant pour les protéines d'entreposage afin de réduire la séquestration du fer nouvellement acquis dans la bactérie et ainsi permettre à ses protéines essentielles de l'utiliser pour diverses réactions métaboliques vitales (Jacques *et al.*, 2006; Masse *et al.*, 2007). La régulation concertée par Fur et RyhB permet donc un ajustement de la

concentration intracellulaire du fer libre et un maintien physiologique du métabolisme ferrique bactérien (Masse et Arguin, 2005).

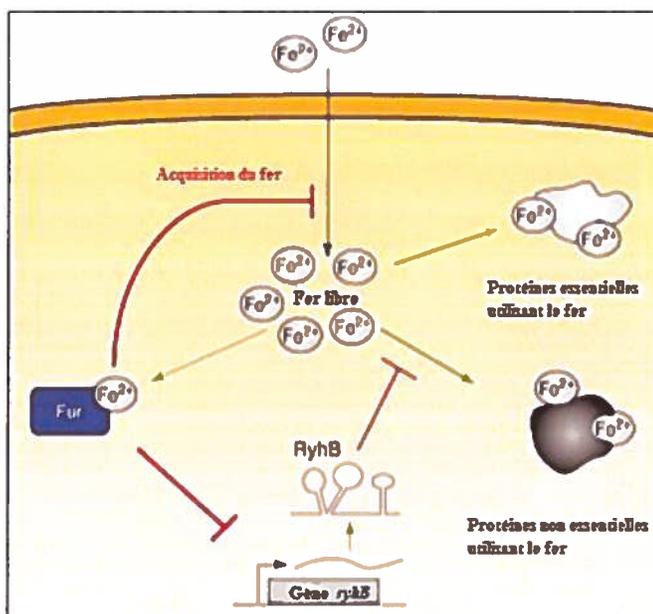


Figure 1.14 : Régulation par Fur et RyhB de l'acquisition et de l'entreposage de fer nouvellement acquis chez *E. coli* K-12 (Masse *et al.*, 2007).

### 1.8.2.2 RyhB et l'acquisition de fer

Il a été démontré que RyhB ne permet pas uniquement l'inactivation de plusieurs gènes, mais bien aussi l'activation de beaucoup d'autres impliqués dans l'homéostasie du fer (Masse *et al.*, 2005). Récemment, une première étude a illustré une activation traductionnelle directe de RyhB sur un gène chez la bactérie *E. coli* K-12. Le gène en question est *shiA* et il code pour une perméase (récepteur membranaire) de l'acide shikimique, un composé aromatique participant dans la biosynthèse des sidérophores de type catécholate (Whipp *et al.*, 1998; Prevost *et al.*, 2007). Plus précisément, RyhB permet la traduction de *shiA* en favorisant la destruction d'une structure inhibitrice intrinsèque de son ARNm, soit l'hélice qui séquestre le site de liaison du ribosome. L'appariement complémentaire de l'ARNc avec la structure inhibitrice conduit ainsi à la libération de l'ARNm de *shiA* et, par

conséquent, à la synthèse de la perméase. Les résultats de l'étude démontrent ainsi que le transport de l'acide shikimique via ShiA est plus important dans des conditions où RyhB est activé, c'est-à-dire lors d'une carence en fer (Prevost *et al.*, 2007).

Suite à ces divers résultats, une récente étude a démontré une autre relation entre RyhB et la biosynthèse de sidérophores, établissant encore une fois l'importance de l'ARNnc au niveau de l'acquisition du fer. Tout d'abord, il a été établi que RyhB est requis pour l'expression physiologique de l'opéron codant pour la biosynthèse de l'entérobactine, soit *entCEBAH*. Ainsi, RyhB a un effet sur la concentration intracellulaire en fer, car il stimulerait l'importation du métal en promouvant la production de l'entérobactine lors de conditions de carence en fer. De plus, il affecte la synthèse du sidérophore en réprimant directement la traduction de *cysE*, qui code pour une sérine acétyltransférase. La biodisponibilité de la sérine est réduite en présence de CysE, car cette dernière l'utilise comme substrat pour la biosynthèse de la cystéine. La sérine est une composante essentielle à la formation de l'entérobactine (Walsh et Marshall, 2004; Salvail *et al.*, 2010). Ainsi, RyhB permettrait une plus grande utilisation de la sérine pour la synthèse de l'entérobactine en réduisant l'activité de CysE (Salvail *et al.*, 2010). Il a été rapporté que RyhB a aussi la capacité de réguler partiellement et négativement la synthèse de la protéine Fur en reconnaissant une séquence en amont du codon d'initiation de l'ARNm (Vecerek *et al.*, 2007). RyhB est donc impliqué de manière importante dans la régulation des systèmes d'acquisition du fer. Aussi, tel que mentionné précédemment, la biosynthèse des salmochélines dépend de la machinerie de l'entérobactine. De ce fait, il est logique d'affirmer que RyhB joue un rôle essentiel tant au niveau de la production des salmochélines que de leur précurseur, faisant de lui un potentiel régulateur global de la synthèse des sidérophores de type cathécolate.

### 1.8.2.3 RyhB et le stress oxydatif

Depuis plusieurs années, diverses études ont démontré l'importance des petits ARN non codants au niveau de l'adaptation des bactéries à certains stress métaboliques. RyhB joue un rôle important dans la régulation au stress oxydatif. Tel que mentionné précédemment, il réprime directement le gène *sodB* codant pour la superoxyde dismutase ferrique lors des conditions de carence en fer (Masse et

Gottesman, 2002). De plus, il a été démontré que RyhB joue un rôle en tant que régulateur dans l'adaptation des entérobactéries à divers stress via les protéines régulatrices ayant un groupement fer-soufre (Fe-S) (Desnoyers *et al.*, 2009).

#### 1.8.2.3.1 Groupements Fe-S

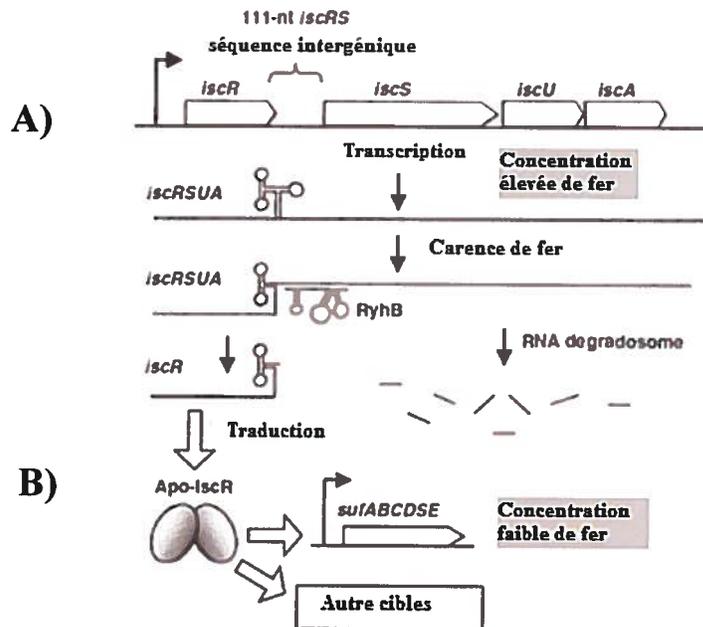
Il existe plus de cent protéines possédant des groupements prosthétiques Fe-S. Ces protéines sont essentielles pour la majorité des organismes en raison du fait qu'elles sont impliquées dans plusieurs réactions métaboliques importantes, telles que la photosynthèse, la fixation de l'azote, la respiration cellulaire et la régulation génique. Ces protéines dépendent de leur groupement Fe-S afin d'exécuter leur fonction régulatrice en tant que senseur de l'environnement intracellulaire. En effet, grâce à leur conformité structurale, leur protéine-hôte possède la capacité de détecter les niveaux de fer intracellulaire et la présence d'un stress oxydatif (Kiley et Beinert, 2003).

#### 1.8.2.3.2 Systèmes de production des groupements Fe-S et leur régulation

Chez *E. coli*, les groupements Fe-S des protéines essentielles sont principalement synthétisés par les systèmes de production ISC (« *iron-sulphur cluster* ») et SUF (« *sulfur utilization factor* ») (Takahashi et Nakamura, 1999; Outten *et al.*, 2004). Les composantes de chaque système sont respectivement codées par les opérons *iscRSUA* et *sufABCDSE* (Schwartz *et al.*, 2001; Outten *et al.*, 2004). Toutefois, malgré l'expression des deux systèmes dans des conditions de carence en fer, les opérons sont activés par différents mécanismes de régulation (Desnoyers *et al.*, 2009). En effet, l'opéron *suf* est sous le contrôle négatif de la protéine Fur contrairement à l'opéron *isc* (Outten *et al.*, 2004). Ce dernier est plutôt régulé par le répresseur transcriptionnel IscR. Seul IscR lié à un groupement Fe-S peut permettre l'auto-répression (Schwartz *et al.*, 2001; Giel *et al.*, 2006). En d'autres mots, lorsque le groupement Fe-S du régulateur devient instable dû à un stress, la protéine IscR est sous la forme « apo » permettant donc à l'opéron *isc* d'être actif. Les protéines IscS, IscU et IscA ainsi produites sont en charge de la biosynthèse des groupements Fe-S, qui pourraient être utilisés par différentes protéines impliquées dans la résistance au

stress oxydatif (Giel *et al.*, 2006). Par exemple, la protéine SoxR possède un groupement Fe-S qui lui est nécessaire pour réguler les mécanismes de protection contre le stress oxydatif (section 1.7.2.1; page 40). Il a été démontré que la forme « apo » de la protéine IscR agit aussi comme activateur transcriptionnel de l'opéron *suf* (Outten *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2008).

Récemment, Desnoyers et ses collaborateurs ont démontré que l'ARNnc RyhB régule l'opéron *isc* lors de conditions de carence en fer chez *E. coli* K-12. Plus précisément, RyhB joue un rôle dans la biosynthèse des groupements Fe-S en dégradant partiellement les transcrits géniques *iscSUA*, sans toutefois affecter le fragment codant pour la protéine régulatrice IscR. En effet, cette section semble être protégée par une structure secondaire composée de séquences palindromiques répétitives et localisée entre les gènes *iscR* et *iscS* (Desnoyers *et al.*, 2009). Un modèle de régulation par RyhB chez les entérobactéries a donc été élaboré, démontrant son importance physiologique (Figure 1.15).



**Figure 1.15 : Modèle de dégradation partielle de l'opéron *iscRSUA* par RyhB chez les entérobactéries. A) Conditions élevées en fer B) Conditions de carence en fer (Desnoyers *et al.*, 2009).**

Lors de conditions suffisantes ou élevées en fer, la production du système ISC est permise et il est responsable de la biosynthèse des groupements Fe-S (Figure 1.15 A). Lorsque la concentration intracellulaire en fer devient faible, RyhB activé est en mesure de réprimer la traduction des composantes nécessaires à la synthèse de groupements Fe-S (IscS, IscU et IscA), mais permet toujours la production du régulateur IscR (Figure 1.15 B). Étant dans des conditions de carence en fer, IscR se trouve sous sa forme « apo », permettant donc d'activer le second système de synthèse de groupement Fe-S, SUF (Figure 1.15 B). Celui-ci en devient le principal producteur sous cette condition. Lorsque la concentration intracellulaire en fer se rétablit ou devient élevée (stress oxydatif), SUF et RyhB sont réprimés par le régulateur Fur, permettant ainsi l'activation du système ISC (Desnoyers *et al.*, 2009). En résumé, la régulation par RyhB des différentes protéines possédant un groupement Fe-S démontre l'importance de l'ARNnc au niveau de l'adaptation de la bactérie à plusieurs stress ferriques et oxydatifs.

#### **1.8.2.4 Rôles de RyhB dans la virulence bactérienne**

Diverses études ont étudié le rôle de RyhB (et de ses homologues) dans la virulence bactérienne. Plusieurs d'entre elles ont démontré que cet ARNnc a la capacité de réguler l'expression de plusieurs facteurs de virulence.

Tout d'abord, RyhB régule divers transcrits codant pour des protéines essentielles et il est nécessaire à la formation de biofilm chez la bactérie *Vibrio cholerae*. Toutefois, il ne semble pas être primordial pour la colonisation de la bactérie chez la souris (Davis *et al.*, 2005; Mey *et al.*, 2005). De plus, il participe à la régulation de la résistance à l'acidité chez *Shigella flexneri*, agent causant la dysenterie (Oglesby *et al.*, 2005). Cette résistance est importante pour la survie du pathogène en raison du fait que le lieu d'infection, soit le tractus intestinal, est acide (Gorden et Small, 1993). Il a été démontré que RyhB réprime l'expression du gène *evgA*, codant pour l'activateur transcriptionnel EvgA, et de l'oxydoréductase putative *ydeP* essentiel pour la résistance à l'acidité. Cette résistance semblerait donc être plus importante dans des conditions où la quantité de fer est suffisante, car Fur est actif et il peut réprimer RyhB. Ceci permet ainsi l'expression du gène *ydeP* via son activateur EvgA. La régulation concertée par RyhB, Fur et *ydeP* permet à l'espèce pathogène de

s'adapter à son milieu et de lui permettre de causer une infection (Oglesby *et al.*, 2005). De plus, RyhB participe à la pathogenèse de la même espèce en régulant divers facteurs de virulence. Plus précisément, il réprime l'expression de VirB, un activateur transcriptionnel de plusieurs opérons impliqués dans la pathogenèse. Cette répression n'est présente que lorsque la bactérie se trouve dans un milieu pauvre en fer, soit à l'intérieur de la cellule hôte, car une expression inappropriée du régulon VirB peut provoquer une lyse cellulaire prématurée. De ce fait, RyhB, actif dans ce milieu (Fur n'est pas produit), réprime VirB prévenant ainsi une dérégulation du processus infectieux (Murphy et Payne, 2007).

Il existe aussi quelques systèmes de régulation homologues à RyhB qui sont retrouvés chez d'autres espèces bactériennes pathogènes. Il y a en trois principaux dont PrrF chez *P. aeruginosa*, NrrF chez *N. meningitidis* et FsrA chez *Bacillus subtilis* (Wilderman *et al.*, 2004; Mellin *et al.*, 2007; Gaballa *et al.*, 2008). Ces ARNnc répriment divers transcrits qui codent pour des protéines utilisant le fer et régulent une variété de cibles similaires à celles de RyhB, incluant les gènes *sodB* et *sdh*.

RyhB possède donc un rôle potentiellement important dans la virulence chez diverses espèces bactériennes. Toutefois, ses rôles individuels et de concert avec Fur, tant au niveau de la régulation des systèmes d'acquisition du fer que des systèmes de protection contre le stress oxydatif chez les ExPEC, n'ont pas encore été élucidés.

La caractérisation des rôles des régulateurs de l'homéostasie du fer, Fur et RyhB, chez la souche UPEC CFT073 aux niveaux des mécanismes d'acquisition du fer et de la protection contre le stress oxydatif, et ce, dans le contexte d'une infection du tractus urinaire murin, fait l'objet de l'étude présentée dans ce mémoire.

## **Chapitre 2. Matériel et méthodes**

## 2.1 Souches bactériennes

Les différentes souches d'*Escherichia coli* utilisées dans cette étude sont listées, avec leurs caractéristiques, dans le Tableau 2.1. Toutes les souches sont entreposées avec 25% de glycérol (v/v) - milieu LB à -80°C.

**Tableau 2.1 : Souches d'*Escherichia coli* utilisées pour l'étude**

Souches	Génotype et/ou phénotype <sup>a</sup>	Source ou référence
<i>E. coli</i> K-12		
EM1055	DJ480 ΔX74 <i>lac</i> dérivé de MG1655 ( <i>E. coli</i> K-12)	(Masse et Gottesman, 2002)
EM1238	EM1055 Δ <i>ryhB</i> :: <i>cat</i> ; Cat <sup>R</sup>	(Masse et Gottesman, 2002)
KP392	EM1055 Δ <i>fur</i> :: <i>kan</i> ; Kan <sup>R</sup>	(Masse et Gottesman, 2002)
DH5α	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> (Δ 80 <i>lacZ</i> ΔM15) <i>endA1 glnI'</i> <sub>44</sub> <i>thi-1 recA1 relA1 gvrA96 deoR</i> Δ ( <i>lacZYA-argF</i> ) U169, <i>hsdR17</i> (r <sub>K</sub> <sup>-</sup> m <sub>K</sub> <sup>+</sup> )	Bethesda Laboratories
MGN617	<i>thi thr leu tonA lacY glnI'</i> <i>supE</i> Δ <i>asdA4 recA</i> ::RP4-2-Tc ::Mu [λpir]; Kan <sup>R</sup>	(Dozois <i>et al.</i> , 2000)
S17	<i>hsdR pro recA</i> RP4-2-Tc :: Mu-Kan :: Tn7 [λpir]; Kan <sup>R</sup>	(Simon, 1984)
JW0669	BW25113 Δ <i>fur</i> :: <i>FRT</i>	(Kitagawa <i>et al.</i> , 2005; Baba <i>et al.</i> , 2006)
CFT073	<i>Escherichia coli</i> pathogène du tractus urinaire O6 : H1 : K <sup>+</sup>	(Mobley <i>et al.</i> , 1990)
QT2230	CFT073 Δ <i>ryhB</i> :: <i>cat</i> ; Cat <sup>R</sup>	Cette étude
QT2237	CFT073 Δ <i>fur</i> :: <i>kan</i> ; Kan <sup>R</sup>	Cette étude
QT2637	CFT073 Δ <i>fur</i> :: <i>FRT</i>	Cette étude
QT2240	QT2230 Δ <i>fur</i> :: <i>kan</i> ; Cat <sup>R</sup> et Kan <sup>R</sup>	Cette étude
QT2634	QT2230 Δ <i>fur</i> :: <i>FRT</i> ; Cat <sup>R</sup>	Cette étude
QT2639	QT2634 attTn7 :: <i>fur</i> ; Cat <sup>R</sup> et Gen <sup>R</sup>	Cette étude
QT2469	QT2230 attTn7 :: <i>ryhB</i> ; Cat <sup>R</sup> et Gen <sup>R</sup>	Cette étude
QT2792	QT2637 <i>lac</i> :: <i>fur</i> , Kan <sup>R</sup>	Cette étude
QT2808	QT2639 <i>lac</i> :: <i>ryhB</i> ; Cat <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup> et Kan <sup>R</sup>	Cette étude
QT1081	CFT073 Δ <i>lacZYA</i>	(Sabri <i>et al.</i> , 2009)

<sup>a</sup> Cat<sup>R</sup> = résistance au chloramphénicol ; Kan<sup>R</sup> = résistance à la kanamycine ; Gen<sup>R</sup> = résistance à la gentamicine.

## 2.2 Milieux et conditions de croissance

Les cultures bactériennes ont été régulièrement effectuées dans le milieu Luria-Bertani (LB) liquide ou solide à 37°C. Lorsque nécessaire, et afin de sélectionner les mutations, les milieux de culture utilisés pour les diverses expériences ont été supplémentés avec les concentrations d'antibiotiques suivantes : chloramphénicol 30 µg/ml, kanamycine 30 µg/ml, gentamicine 50 µg/ml et ampicilline 100 µg/ml. Le milieu minimal (pauvre en fer) M63-glycérol a aussi été utilisé pour certaines expériences. Le M63-glycérol est composé de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 39 mM, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 80 mM et (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 15 mM. Ce mélange a été ajusté à un pH de 7.5 avec du KOH et a été supplémenté avec les produits suivants : MgCl<sub>2</sub> 1 mM, CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM et du glycérol 0,6%. La préparation de ces derniers a été réalisée dans des bouteilles et avec des instruments en plastique afin de minimiser les traces de fer. Pour les courbes de croissance, l'urine humaine a aussi été utilisée. Le milieu est constitué d'échantillons filtrés provenant de 3 femmes différentes. Le mélange d'urine a été par la suite entreposé à 4°C durant les périodes d'expérimentation.

## 2.3 PCR (Réaction de polymérisation en chaîne)

La PCR a été utilisée afin de confirmer les génotypes de tous les mutants de l'étude. Principalement, cette méthode a été utilisée afin de cribler et d'amplifier les gènes visés. Le criblage a été effectué en utilisant l'ADN polymérase *Taq* (*Feldan Bio*, St-Laurent, Québec) et les réactions ont été réalisées dans un appareil *Mastercycler Gradient* (*Eppendorf*). Les conditions des réactions ont été suivies selon le protocole du fournisseur pour une réaction de 30 cycles. Afin d'avoir une plus grande fidélité, l'amplification des gènes ciblés a été effectuée avec l'ADN polymérase *Herculase* (*Stratagene*, LaJolla, CA, USA). Dans ces cas-ci, les conditions de PCR pour les cibles entre 1 et 10 kb, avec un total de 30 cycles, ont été utilisées selon le protocole du fournisseur. La purification des produits PCR a été réalisée en utilisant la trousse *Qiagen*, (*Qiagen Inc.*, Ontario, Canada) tel que recommandé par le fournisseur. Les amorces utilisées pour chaque séquence génique ciblée sont présentées dans le Tableau 2.2.

**Tableau 2.2 : Amorces utilisées pour l'étude**

Amorces	Gène ou séquence visé <sup>a</sup>	Séquence (5'-3')
CDM1171	<i>ryhB</i> :: <i>cat</i>	TTTGGGGTAAATGTCCCTTTC
CMD1172	<i>ryhB</i> :: <i>cat</i>	GTGCGCATAACGAACACAAG
CDM1188	<i>fur</i> :: <i>kan</i>	TCATTTAGGCGTGGCAATTC
CMD1189	<i>fur</i> :: <i>kan</i>	TGAGAGCTGTA ACTCTCGCTTTTC
CMD290	<i>fur</i> :: <i>FRT</i>	CGCGCCAAAGGCACGATGTT
CMD291	<i>fur</i> :: <i>FRT</i>	GCAGCAAAGAAGATCTGGAAGC
CDM1269	<i>fur</i>	TGCTGTGGTACCTGTAAGCTGTGCCACGTTTT __ = site de restriction KpnI ajouté
CDM1270	<i>fur</i>	ACAGGTACCTGAGAGCTGTA ACTCTCGCTTTTC __ = site de restriction KpnI ajouté
CDM1271	<i>ryhB</i>	GTA <u>CTCGAGT</u> GTTTCTGCGTGGCGTATTAC __ = site de restriction XhoI ajouté
CDM1272	<i>ryhB</i>	CCTCCCGGAAAGCGGACGTGGTTCCTAC __ = site de restriction XmaI ajouté
CDM175	M13- pGEM	GTAAAACGACGGCCAGTGA
CDM176	M13- pGEM	CAGGAAACAGCTATGACCATG
CMD1067	Tn7T-Gen de AY599231	TGCGGTCA <u>AATTG</u> TACCGCACAGATGCGTAAGGAGAA __ = site de restriction MfeI ajouté
CMD1068	Tn7T-Gen de AY599231	AACGCCGCT <u>TCGAG</u> TTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCA __ = site de restriction PspXI ajouté
CMD1073	<i>pstS</i> Tn7 (R)	AGATCAGTTTGGTGTACGCCAGGT
CMD1394	<i>'lacA</i> (R) (amorces dégénérées)	GATAAGCGVAGCGYATCA

<sup>a</sup> Cat = chloramphenicol ; Kan = kanamycin ; Gen = gentamicine; R = amorces antisens

## 2.4 La mutagenèse

La technique de Datsenko et Wanner a été utilisée pour réaliser les mutants du projet (Datsenko et Wanner, 2000). Celle-ci consiste à remplacer la séquence du gène ciblé, au sein du chromosome, par une séquence homologue codant pour une cassette de résistance à un antibiotique. Ce remplacement est effectué grâce au système  $\lambda$  *Red* recombinase retrouvé sur le plasmide pKD46 (Tableau 2.3) (Datsenko et Wanner, 2000). Le système code pour les gènes  $\gamma$ ,  $\beta$  et *exo* dont les produits amènent simultanément à l'inhibition de l'exonucléase  $\nu$  RecBCD de la bactérie hôte permettant donc l'accès à l'ADN et à la recombinaison de l'allèle à introduire.

Pour débiter, le plasmide pKD46 a été préalablement introduit dans la souche à muter, soit la souche CFT073. Suite à cela, une culture de la souche CFT073, ayant le plasmide pKD46 et ayant poussée à 30°C avec agitation durant 16 à 18 heures, a été diluée (1 : 100) dans le milieu LB. Cette culture a été cultivée jusqu'à une D.O.<sub>550nm</sub> de 0,8, à 30°C, avec agitation, et en présence de L-arabinose 100 mM, pour induire l'expression du système  $\lambda$  *Red* recombinase. Un volume de 10 ml de culture a été centrifugé à 2700g à 4°C pendant 15 minutes. Le culot a été récupéré, puis lavé 2 fois avec 10 ml d'eau stérile froide et 1 fois avec 5 ml de glycérol 10% froid. Une centrifugation à 2700g à 4°C pendant 15 minutes a aussi été effectuée entre chaque lavage. Le culot final obtenu contenait les bactéries électrocompétentes (CFT073, pKD46). En parallèle, les régions des souches EM1238 (*ryhB* :: *cat*) et K392 (*fur* :: *kan*) ont été amplifiées par PCR avec des amorces ayant des régions homologues aux gènes visés (Tableau 2.2), puis les allèles ont été purifiés avec la trousse *Qiagen*, tel que recommandé par le fournisseur. Ainsi, un volume de 70  $\mu$ l de bactéries électrocompétentes a été mélangé dans une cuvette à électroporation avec 400 ng d'ADN amplifié, soit l'allèle *ryhB* :: *cat* purifié de EM1238 et/ou l'allèle *fur* :: *kan* purifié de KP392. L'électroporation a été exécutée avec la machine *Bio-Rad Gene Pulser* programmée à 1.8kV (25 mF avec *Pulse controller* de 200 ohms). Les bactéries transformées QT2230 (CFT073  $\Delta$  *ryhB* :: *cat*) et QT2237 (CFT073  $\Delta$  *fur* :: *kan*) ont été cultivées dans le milieu LB à 30°C, avec agitation, durant environ 3 heures. Le culot de chaque culture a ensuite été étalé sur une gélose LB, avec l'antibiotique correspondant, puis incubé à 37°C pendant 16 heures afin de causer la perte du plasmide thermosensible. Pour ce qui est de la génération du double mutant QT2240 (CFT073  $\Delta$  *ryhB* :: *cat*  $\Delta$  *fur* :: *km*), la même procédure a été utilisée, mais,

cette fois-ci, il y a eu introduction du plasmide pKD46 dans la souche QT2230 afin de pouvoir la transformer avec l'allèle *fur :: kan* de KP392. Les mutants de l'étude sont présentés dans le Tableau 2.1.

## 2.5 Délétion de la cassette de résistance à l'antibiotique

Le plasmide possédant les gènes du système de transposase Tn7 (pIJ258), et qui est nécessaire à la complémentation des souches, code pour la résistance à la kanamycine. Pour des raisons de manipulations adéquates, les cassettes de résistance à la kanamycine des souches mutantes QT2237 et QT2240 ont dû être enlevées. Or, ces cassettes ne possèdent pas de sites FRT répétitifs qui permettraient leur délétion par Flp. Ainsi, des nouveaux mutants ont été générés, et ce, à partir d'une cassette de résistance à la kanamycine qui, cette fois-ci, possédait les sites *FRT*. À ce titre, l'allèle *fur :: kan* de la souche JW0669 mutée (BW25113  $\Delta fur :: kan$ ) a été amplifiée par PCR (*Herculase*) avec les amorces CMD1188-1189, puis elle a été purifiée avec la trousse *Qiagen*. La méthode d'électroporation décrite dans la section 2.4 a été utilisée afin d'introduire l'allèle amplifié dans les souches électrocompétentes QT2330 (CFT073  $\Delta ryhB :: cat$ ) et CFT073, ce qui a permis de respectivement générer le double mutant ainsi que le mutant simple *fur*. Par la suite, les cassettes de résistance à la kanamycine ont été éliminées par l'entremise du plasmide pCP20 qui code pour la recombinase Flp (Tableau 2.3). Celle-ci reconnaît les sites FRT répétitifs situés de chaque côté de la cassette de résistance et, de ce fait, peut les éliminer par excision (Datsenko et Wanner, 2000). Ainsi, le plasmide pCP20 a été introduit par électroporation dans les souches mutantes, puis les souches transformées ont été incubées à 30°C pour 24 heures afin de laisser le temps à la flipase d'exciser la cassette. Les clones ont été sélectionnés selon leur sensibilité à la kanamycine, puis les souches ont été incubées à 37°C afin de causer la perte du plasmide thermosensible. La délétion de la cassette de résistance à l'antibiotique a été confirmée par PCR, avec les amorces CMD290-291, et les souches mutantes obtenues sont QT2637 (CFT073  $\Delta fur :: FRT$ ) et QT2634 (CFT073  $\Delta ryhB :: cat \Delta fur :: FRT$ ). Les souches sont listées dans le Tableau 2.1.

## 2.6 Complémentation

Les différents plasmides utilisés pour la complémentation des souches mutantes d'*Escherichia coli* sont listés, avec leurs caractéristiques, dans le Tableau 2.3.

**Tableau 2.3 : Plasmides utilisés pour l'étude**

Plasmides	Génotype <sup>a</sup>	Source ou référence
pKD46	Plasmide $\lambda$ <i>Red</i> recombinase; thermosensible; Amp <sup>R</sup>	(Datsenko et Wanner, 2000)
pGEM <sup>®</sup> -T	Vecteur de clonage ; Amp <sup>R</sup>	Promega
pIJ319	pGEM <sup>®</sup> -T :: <i>fur</i> , allèle ayant des sites pour l'enzyme de restriction KpnI; Amp <sup>R</sup>	Cette étude
pIJ321	pGEM <sup>®</sup> -T :: <i>ryhB</i> , allèle ayant des sites pour les enzymes de restrictions XhoI et XmaI; Amp <sup>R</sup>	Cette étude
pIJ253	pGP704 :: Tn7T-Gen ; Amp <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	Crépin <i>et al.</i> , 2011 (manuscrit en préparation)
pIJ326	pIJ253 :: <i>ryhB</i> de pIJ321 ; Amp <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	Cette étude
pIJ336	pIJ253 :: <i>fur</i> de pIJ319 ; Amp <sup>R</sup> , Gen <sup>R</sup>	Cette étude
pIJ258	pST6K :: <i>tnsABCD</i> ; Kan <sup>R</sup>	Crépin <i>et al.</i> , 2011 (manuscrit en préparation)
pIJ266	pBluescript II SK <sup>+</sup> :: <i>lacZ</i> '- <i>kan</i> -' <i>lacA</i> ; Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Caza <i>et al.</i> , 2011)
pIJ376	pIJ266 :: <i>fur</i> de pIJ319; Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Cette étude
pIJ377	pIJ266 :: <i>ryhB</i> de pIJ321; Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Cette étude
pMEG-375	<i>sacRB</i> <i>mobRP4</i> <i>oriR6K</i> , Cat <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	(Dozois <i>et al.</i> , 2003)
pIJ386	pMEG-375 :: <i>lacZ</i> '- <i>kan</i> - <i>ryhB</i> -' <i>lacA</i> de pIJ377 ; Cat <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Cette étude
pIJ387	pMEG-375 :: <i>lacZ</i> '- <i>kan</i> - <i>fur</i> -' <i>lacA</i> de pIJ376 ; Cat <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Amp <sup>R</sup>	Cette étude
pCP20	Plasmide qui code pour la recombinase Fli; thermosensible; Amp <sup>R</sup> , Cat <sup>R</sup>	(Datsenko et Wanner, 2000)

<sup>a</sup> Cat<sup>R</sup> = résistance au chloramphénicol ; Amp<sup>R</sup> = résistance à l'ampicilline ; Kan<sup>R</sup> = résistance à la kanamycine ; Gen<sup>R</sup> = résistance à la gentamicine.

## 2.6.1 Complémentation au site *attTn7*

La méthode de complémentation chez les entérobactéries utilisant le site *attTn7* chromosomique a été développée au laboratoire du Pr. Charles M. Dozois. Cette technique est avantageuse car la complémentation est réussie par l'intégration simple-copie de l'allèle à un site unique et spécifique dans le chromosome bactérien. La méthode est décrite ci-dessous et fait le sujet d'étude du manuscrit en préparation par Crépin *et al.* 2011<sup>1</sup>.

### 2.6.1.1 Plasmides de clonage

Afin d'effectuer les complémentations, deux constructions plasmidiques ont été réalisées, soient les plasmides pIJ319 et pIJ321 (Tableau 2.3). Ces derniers ont été construits à partir du vecteur pGEM®-T qui possède un gène de résistance à l'ampicilline ainsi qu'un allèle de la  $\beta$ -galactosidase (*lacZ*) contenant un site de multiclonaage (MCS). Le plasmide pIJ319 contient la séquence du gène *fur* avec son promoteur ayant à ses extrémités des sites ajoutés de restrictions pour l'enzyme KpnI. Le plasmide pIJ321 contient la séquence du gène *ryhB* avec son promoteur ayant, à l'extrémité 5', un site ajouté de restriction pour l'enzyme XhoI et, à l'extrémité 3', un site ajouté de restriction pour l'enzyme XmaI (Tableau 2.3).

Pour ce faire, la séquence du gène *fur* ou *ryhB* (incluant leur promoteur respectif) a été tout d'abord amplifiée de la souche sauvage CFT073 avec des amorces spécifiques. Les amorces utilisées sont CDM1269-1270 (*fur*) et CDM1271-1272 (*ryhB*) (Tableau 2.2). Suite à l'amplification des gènes par PCR (*Herculase*), les allèles amplifiés ont été purifiés avec la trousse *Qiagen*, tel que recommandé par le fournisseur. Par la suite, une queue poly-A a été ajoutée aux allèles purifiés, puis ces derniers ont été individuellement introduits dans le plasmide pGEM®-T. Le protocole de ligation (protocole pGEM®-T *vector*) a été suivi tel que recommandé par le fournisseur Promega®. Les produits de ligation ont été par la suite transformés par choc thermique dans la souche *E.coli* K-12 DH5 $\alpha$  selon le protocole de Hanahan, Jessee et Bloom (Hanahan *et al.*, 1991). Les colonies blanches, en présence du

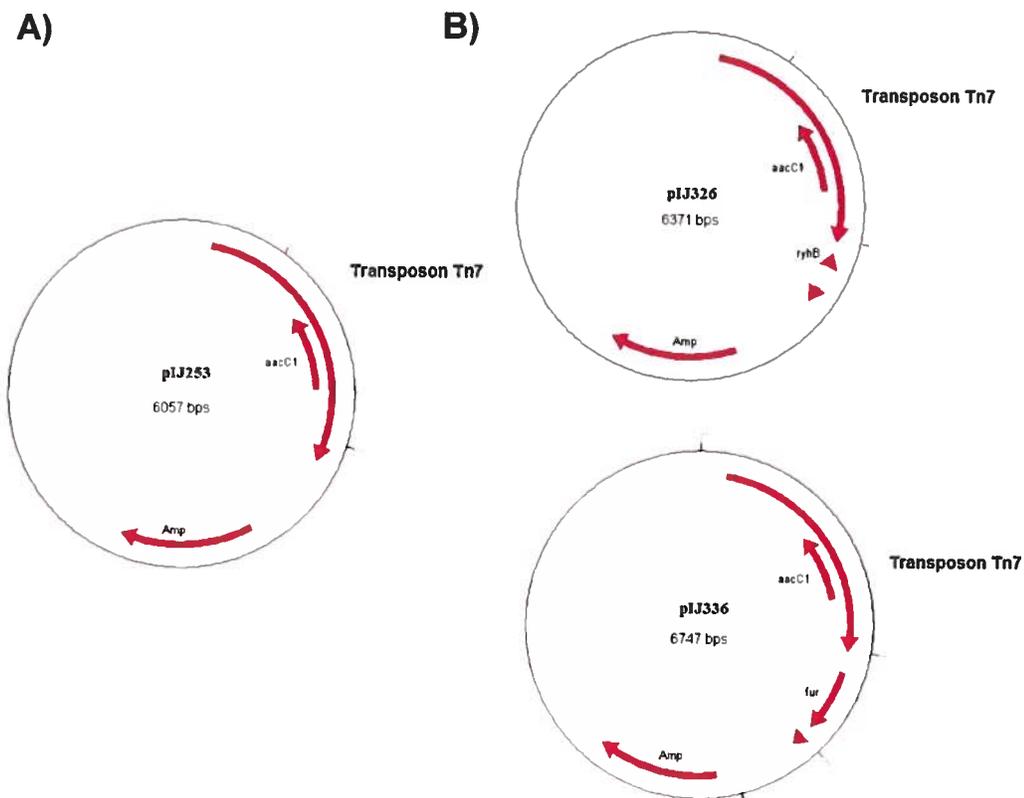
---

<sup>1</sup> Sébastien Crépin, Sébastien Houle, Josée Harel and Charles M. Dozois. 2011. *Chromosomal Complementation Using Tn7 Transposon vectors in Enterobacteriaceae*. Sera soumis à Applied and Environmental Microbiology

substrat X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside), et résistantes à l'ampicilline ont été sélectionnées sur gélose. En effet, l'insertion de l'ADN dans le MCS du gène *lacZ* du vecteur pGEM®-T inactive la  $\beta$ -galactosidase LacZ et bloque la dégradation du substrat chromogénique X-gal. Donc, les clones avec les insertions produiront des colonies blanches et les clones sans les insertions dans le vecteur seront de couleur bleue. La présence des allèles introduits dans le vecteur et leur orientation par rapport au gène *lacZ* ont aussi été vérifiées par PCR, en utilisant une combinaison d'amorces spécifiques au vecteur pGEM®-T (CDM175-176) et d'amorces spécifiques aux allèles *ryhB* ou *fur* (Tableau 2.2). Les clones ayant une orientation opposée à *lacZ* ont été sélectionnés pour les prochaines étapes de complémentation : pIJ319 et pIJ321 (Tableau 2.3).

#### 2.6.1.2 Plasmides de complémentation

Deux plasmides de complémentation ont été construits soient pIJ326 et pIJ336. Ces derniers ont été construits à partir du plasmide pIJ253 possédant une cassette de résistance à la gentamicine entre deux bras Tn7 (transposon Tn7) et une cassette de résistance à l'ampicilline, à l'extérieur du transposon Tn7 (Tableau 2.3). De plus, pIJ253 est un vecteur suicide  $\lambda$  pir-dépendant, c'est-à-dire qu'il a besoin de la protéine *pi* pour se répliquer. Ainsi, les bras Tn7, bordant de part et d'autre le site d'insertion *attTn7* (transposon Tn7 dans la Figure 2.1), sont primordiaux pour la complémentation puisque c'est leur reconnaissance par les transposases TnsABCD qui permettra l'intégration du transposon Tn7 au site *attTn7* chromosomique de la souche à compléter (Crépin *et al.*, 2011 manuscrit en préparation). Ainsi, les plasmides pIJ326 et pIJ336 contiennent respectivement la séquence du gène *ryhB*, provenant de pIJ321, et la séquence du gène *fur*, provenant de pIJ319, dans le transposon Tn7 (Figure 2.1).



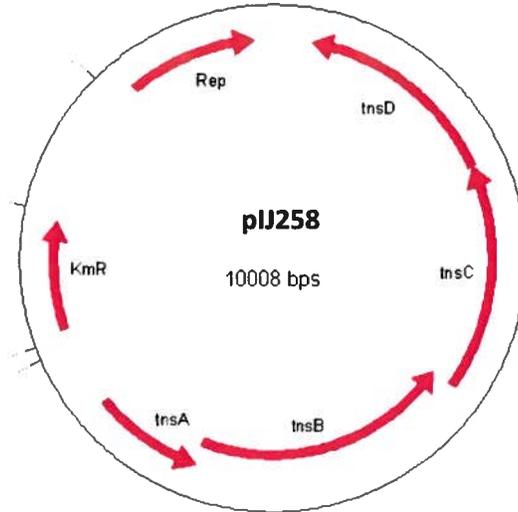
**Figure 2.1 : Plasmides de complémentation. A)** Plasmide pIJ253 ayant le site d'insertion *attTn7* entre deux bras Tn7 (transposon Tn7). **B)** Les plasmides de clonage ayant les allèles *ryhB* (pIJ326) et *fur* (pIJ336) à l'intérieur des bras Tn7. Amp. = cassette de résistance à l'ampicilline à l'extérieur du site d'insertion *attTn7*; *aacC1*: gène de résistance à la gentamicine dans le transposon Tn7.

La construction de ces plasmides a tout d'abord nécessité la gestion des allèles *fur* et *ryhB* présents respectivement sur les plasmides pIJ319 et pIJ321. Le plasmide pIJ319 a donc été digéré avec l'enzyme KpnI et le plasmide pIJ321 avec les enzymes XhoI et XmaI, séquentiellement. Le protocole de digestion a été suivi tel que recommandé par les fournisseurs *New England Lab BioLabs Inc.* (Unit 6 Pickering, Ontario, Canada) pour KpnI, et *Fermentas Inc.* (Burlington, Ontario, Canada) pour les enzymes XhoI/XmaI. Le plasmide porteur, pIJ253, a aussi été digéré par les mêmes enzymes aux sites de restrictions, entre les deux bras Tn7. Suite à cela, les allèles et le plasmide digérés ont été purifiés (la trousse *Qiagen*) et une ligation a été effectuée avec la T4-ligase. Le protocole de ligation a été suivi tel que recommandé par le fournisseur *Fermentas*. Les produits de ligation obtenus ont été par la suite

transformés par choc thermique selon la méthode de Hanahan, Jessee et Bloom (Hanahan *et al.*, 1991) dans la souche de conjugaison *E. coli* MGN617 (Tableau 2.1). Cette souche a une croissance dépendante de l'acide diaminopimélique (DAP), à cause d'une délétion du gène *asd*, et possède la machinerie pour la production de la protéine *pi*, nécessaire à la réplication des plasmides de complémentation. Les colonies résistantes à l'ampicilline et à la gentamicine ont été sélectionnées sur gélose supplémentée en DAP. De plus, l'orientation des allèles par rapport à la cassette de résistance à la gentamycine des plasmides a aussi été vérifiée par PCR, et ce, à l'aide d'une combinaison d'amorces spécifiques au bras Tn7 du vecteur pIJ253 (CMD1067-1068) et aux allèles (Tableau 2.2). Les clones possédant les plasmides désirés (pIJ326 et pIJ336) ont été entreposés à -80°C en attente des prochaines étapes de complémentation (Tableau 2.3).

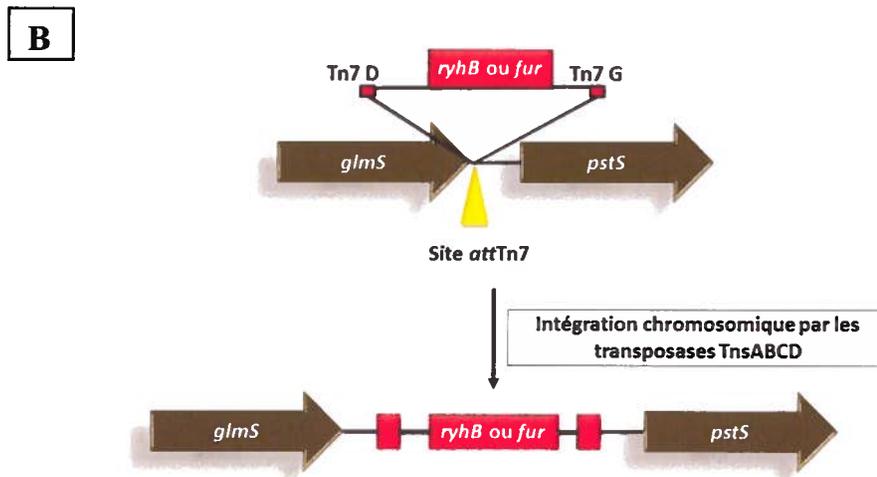
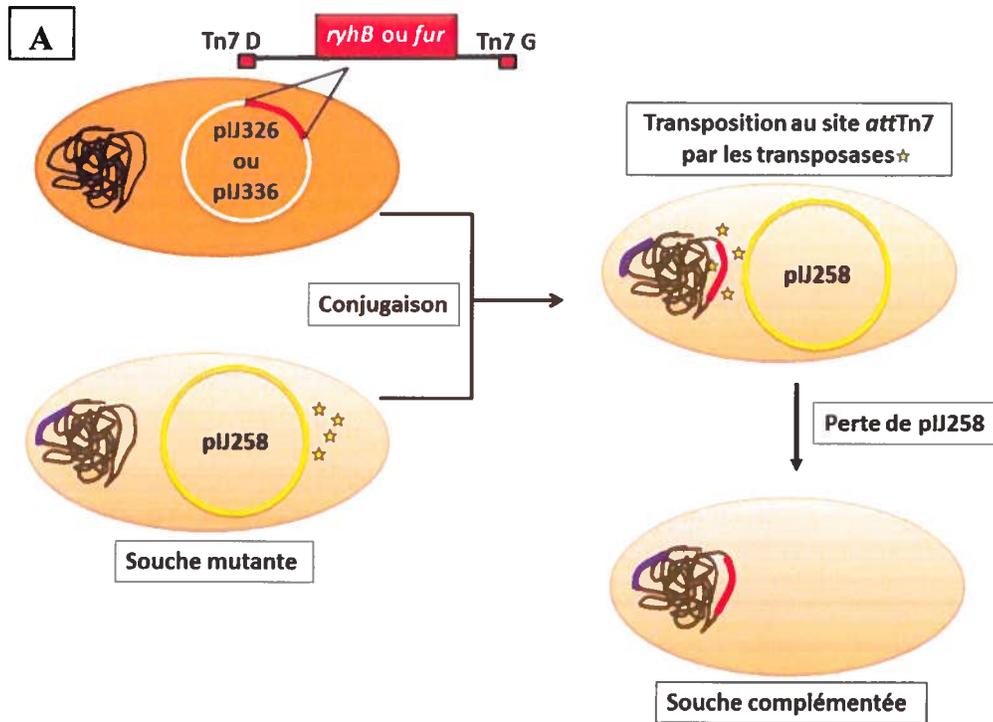
#### 2.6.1.3 Transposition au site attTn7

Le plasmide de transposition (pIJ258) a été préalablement introduit par électroporation dans les souches à compléter, soient QT2230 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*) et QT2634 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*) (Datsenko et Wanner, 2000). Ce plasmide thermosensible possède le système de transposases Tn7 (TnsABCD) nécessaire pour l'excision et pour l'intégration de la séquence contenue entre les deux bras Tn7 (transposon Tn7) des plasmides de complémentation (Figure 2.2) (Crépin *et al.*, 2011 manuscrit en préparation). Celles-ci vont donc permettre la transposition des allèles *ryhB* et *fur*, situés dans le transposon Tn7 des plasmides pIJ326 et pIJ336 respectivement (Figure 2.1), dans le site attTn7 chromosomique situé entre les gènes *glmS* et *pstS* des souches mutantes à compléter. L'intégration est spécifique au site attTn7 et génère une complémentation à simple-copie dans le chromosome bactérien (Figure 2.3B).



**Figure 2.2 : Plasmide pIJ258 codant pour le système de transposases TnsABCD. Rep.= origine de répllication; KmR = gène de résistance à la kanamycine**

La Figure 2.3 démontre les étapes de complémentation ainsi que l'intégration spécifique des allèles à compléter au site *attTn7* chromosomique des souches mutantes. Tout d'abord, les vecteurs de complémentation de la souche *E. coli* MGN617, pIJ326 (contenant l'allèle *ryhB*) ou pIJ336 (contenant l'allèle *fur*), ont été transférés aux souches mutantes possédant le plasmide pIJ258 par une conjugaison de 18 heures à 30°C, sur gélose LB supplémentée de DAP et de kanamycine (Figure 2.3A). Puis les transconjugants ont été sélectionnés sur gélose LB sans DAP supplémentée de gentamicine, afin de favoriser la perte de la souche donneuse MGN617. Les colonies qui ont été choisies sont également sensibles à l'ampicilline suggérant la transposition des allèles au site *attTn7*, et non l'intégration du vecteur dans le chromosome (Figures 2.1B et 2.3). Enfin, l'intégration des allèles au site *attTn7* a été vérifiée par PCR, à l'aide d'une combinaison d'amorces spécifiques au site *psiS* dans le sens 3' ainsi qu'aux allèles dans le sens convenu, soient les CMD1073-CMD1269 pour le gène *fur* et CDM1073-CMD1272 pour le gène *ryhB*. Les souches complémentées obtenues sont : QT2469 (CFT073  $\Delta$  *ryhB* ; *attTn7* :: *ryhB*) et QT2639 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur* ; *attTn7* :: *fur*) (Tableau 2.1 et Figure 2.3).



**Figure 2.3 : Schéma démontrant la génération des souches mutantes complétées avec le gène *ryhB* ou *fur* au site *attTn7* chromosomique. A) Conjugaison des plasmides de complémentation, ayant les allèles à compléter (en rouge) au sein du transposon, entre les deux bras Tn7 (pIJ326-*ryhB*; pIJ336-*fur*), dans la souche mutante possédant le plasmide de transposases pIJ258 (allèle muté = mauve). Suite à l'action des transposases (étoiles), l'allèle est intégré de manière spécifique dans le chromosome bactérien de la souche mutante, qui devient alors complétée. B) Intégration spécifique de l'allèle à compléter au niveau du site *attTn7* chromosomique situé entre les gènes *glmS* et *pstS* de la bactérie mutante. Tn7 D = bras Tn7 droit; Tn7 G = bras Tn7 gauche.**

## 2.6.2 Complémentation au site *lac*

La méthode de complémentation au site *lac* a servi à compléter le mutant *fur*, QT2637 (CFT073  $\Delta$  *fur*) et le double mutant à partir de la souche QT2639 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*; *attTn7* :: *fur*) (section 2.6.1.3).

Pour ce faire, les allèles *fur* et *ryhB*, situés respectivement sur les plasmides pIJ319 et pIJ321, ont été amplifiés par PCR (*Herculase*) et les produits ont été digérés avec les enzymes de restrictions spécifiques, de même que le plasmide de clonage pIJ266, au niveau de sa séquence *lac* (entre la cassette kanamycine et *lacA*) (Tableau 2.3; page 65). Puis, ils ont été purifiés avec la trousse *Qiagen* tel que recommandé par le fournisseur. Ensuite, une ligation a été effectuée avec la T4-ligase, tel que recommandé par le fournisseur *Fermentas*, et les produits de ligation ont été, par la suite, transformés par choc thermique chez *E.coli* K-12 DH5 $\alpha$  (Hanahan *et al.*, 1991). Ainsi, les plasmides obtenus sont pIJ376 (ayant l'allèle *fur*) et pIJ377 (ayant l'allèle *ryhB*) (Tableau 2.3; page 65). Ces derniers ont été utilisés afin de construire les vecteurs d'échange allélique.

Les séquences *lacZ'*-*kan*-*lacA*, possédant les allèles *fur* et *ryhB*, entre le gène de la kanamycine et le gène *lacA*, des plasmides pIJ376 et pIJ377 respectivement, ont été digérés avec l'enzyme de restriction *AvrII* (*Fermentas*) afin de les introduire dans le vecteur d'échange allélique pMEG-375. Ce dernier a aussi été préalablement digéré avec l'enzyme de restriction *XbaI* (*Fermentas*), qui possède des sites compatibles avec *AvrII*. Les allèles ont été purifiés (la trousse *Qiagen*) et ils ont été insérés, avec la T4-ligase (*Fermentas*), dans pMEG-375 digéré. Puis, les nouveaux plasmides ont été transformés dans la souche *E. coli* S17  $\lambda$  *pir*. Les plasmides obtenus sont pIJ386 (ayant l'allèle *ryhB*) et pIJ387 (ayant l'allèle *fur*) (Tableau 2.3; page 65). Ces derniers ont été, par la suite, transformés par choc thermique dans la souche de conjugaison *E. coli* MGN617 (Hanahan *et al.*, 1991). L'intégration des allèles *fur* et *ryhB* dans les souches mutantes a été exécutée par une double recombinaison homologue entre les souches de conjugaison contenant les plasmides d'échange allélique pIJ387 (*lacZ'*-*kan*-*fur*-*lacA*) et pIJ386 (*lacZ'*-*kan*-*ryhB*-*lacA*), ainsi que les mutants QT2637 (CFT073  $\Delta$  *fur*) et QT2639 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur* ; *attTn7* :: *fur*), respectivement. Les séquences *lac* possédant les allèles ont été ainsi intégrées spécifiquement au site *lac* des souches mutantes, ce qui a généré les souches complémentées suivantes : QT2792

(CFT073  $\Delta fur$  ; *lac* :: *fur*) et QT2808 (CFT073  $\Delta ryhB \Delta fur$  ; *attTn7* :: *fur*, *lac* :: *ryhB*) (Tableau 2.1; page 60). Les clones obtenus ont aussi été sélectionnés sur une gélose MacConkey, supplémentée en kanamycine, puis une étape de vérification par PCR a été effectuée en utilisant des amorces spécifiques aux allèles et à *lacA* (Tableau 2.2; page 62). La gélose MacConkey permet la vérification du phénotype Lac-négatif démontrant la recombinaison homologue au site *lac*.

Somme toute, les souches complémentées nécessaires à l'étude, et générées grâce aux deux méthodes de complémentation, sont QT2469 (CFT073  $\Delta ryhB$  ; *attTn7* :: *ryhB*), QT2792 (CFT073  $\Delta fur$  ; *lac* :: *fur*) et QT2808 (CFT073  $\Delta ryhB \Delta fur$  ; *attTn7* :: *fur*, *lac* :: *ryhB*) (Tableau 2.1; page 60).

## 2.7 Infection du tractus urinaire des souris CBA/J

Le protocole de co-infection ascendante du tractus urinaire murin a été adapté de Hagberg et ses collaborateurs (Hagberg *et al.*, 1983). Les procédures et les modalités, incluant le choix de la lignée de souris, ont été préalablement établies et ajustées, au sein du laboratoire, afin d'étudier adéquatement les ITUs causées par les UPEC. Tout d'abord, un inoculum a été préparé avec un mélange contenant une quantité égale de la souche QT1081 (CFT073  $\Delta lacZYA$ ) et une des souches mutantes suivantes : QT2230 (CFT073  $\Delta ryhB$ ) ; QT2237 (CFT073  $\Delta fur$ ) ; QT2240 (CFT073  $\Delta ryhB \Delta fur$ ) (Tableau 2.1; page 60). Les mutants étaient Lac<sup>+</sup> et la souche QT1081 était Lac<sup>-</sup>, permettant une différenciation des souches sur gélose MacConkey. Une quinzaine de souris femelles CBA/J âgées de 6 semaines ont été utilisées pour les infections ascendantes du tractus urinaire, en allouant 5 souris pour les souches mutantes QT2230 et QT2637 et 10 souris pour la souche double mutante QT2240.

Pour procéder à l'étape d'infection, les souris ont été anesthésiées par injection intra péritonéale avec 40  $\mu$ l de cocktail anesthésiant contenant 5 ml de Kétamine (Vetalar<sup>®</sup>/Bioniche), 2,5 ml de Xylazine (Rompum<sup>®</sup>/Bayer HealthCare), 1,5 ml d'Acépromazine (Atravet<sup>®</sup>/Ayerst) et 1,5 ml de saline. L'urine contenue dans la vessie a été préalablement récoltée afin de vérifier la présence d'une contamination bactérienne. Un cathéter a été introduit dans l'urètre de la souris afin d'injecter, par voie transurétrale, 20  $\mu$ l d'inoculum bactérien (environ 10<sup>9</sup> CFU) dans la vessie de la souris.

Après 48 heures d'infection, l'autopsie des souris a été effectuée. Les souris ont été anesthésiées, tel que précédemment expliqué, et euthanasiées dans une chambre à dioxyde de carbone (CO<sub>2</sub>). L'extérieur de la vessie et des reins a été échantillonné avec un écouvillon stérile qui a été imprégné de tampon salin, le BSG (NaCl 0,15 M, KH<sub>2</sub>PO<sub>2</sub> 2,2 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 4,2 mM, 0,01% (m/v) gélatine). La vessie et les reins ont été prélevés. La masse de chaque organe a été mesurée afin de pouvoir déterminer la quantité de bactéries, en CFU, par gramme de tissu. Les organes, resuspendus dans du BSG 1X (1 : 5), ont été homogénéisés, puis étalés sur des géloses MacConkey. Plusieurs dilutions, avec du BSG, ont été effectuées afin de faciliter le dénombrement bactérien. La quantité de bactéries en CFU par volume d'homogénat de tissu a été déterminée pour chaque souris et le log<sub>10</sub> de ces rapports ont été calculés afin de créer des graphiques de résultats.

Les mono-infections ont été effectuées de manière semblable aux co-infections sauf que l'inoculum de départ contenait uniquement une souche à tester : la souche sauvage CFT073, la souche double mutante QT2240 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*) ou la souche complétée QT2808 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*; *attTn7* :: *fur*, *lac* :: *ryhB*) (Tableau 2.1; page 60). Un inoculum de la souche sauvage CFT073 a été ainsi testé en parallèle. Un total de 10 souris par souche a été alloué pour l'expérience. Les procédures d'anesthésie, de cathétérisation, d'injection et de prélèvement d'organes sont les mêmes que celles des co-infections. Toutefois, le décompte bactérien pour chaque souche a été fait sur des géloses MacConkey séparées.

## 2.8 Courbes de croissance

La souche sauvage CFT073, les mutants dérivés (QT2230, QT2637 et QT2634) et les souches complétées (QT2469, QT2792 et QT2808) (Tableau 2.1; page 60) ont été évalués pour leur capacité à croître dans différents milieux de culture, soit le LB, le milieu minimal M63-glycérol et l'urine humaine. Pour chaque souche testée, 30  $\mu$ l d'une préculture de chaque souche (croissance de 18 heures à 37°C dans le LB) ont été mélangés dans 3 ml de milieu riche LB et ont été poussés pour 3 heures à 37°C (dilution 1 :100). Puis 10  $\mu$ l de chaque culture ont été mélangés à 1 ml de milieu de culture (dilution 1 :100). Pour chaque souche et pour chaque milieu, 4 répliques de 250  $\mu$ l ont été effectuées dans une plaque dont la lecture a été exécutée

par l'appareil *BioscreenC* (Growth Curve USA), programmé pour une lecture de densité optique (D.O.) à 600nm, toutes les 15 minutes, pendant 24 heures, avec agitation, à 37°C.

## 2.9 Test de survie bactérienne au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

La souche sauvage CFT073, les mutants dérivés (QT2230, QT2637 et QT2634) et les souches complémentées (QT2469, QT2792 et QT2808) (Tableau 2.1; page 60) ont été évalués pour leur capacité à survivre dans différents milieux de culture, dont le LB et le milieu minimal M63-glycérol, en présence de stress oxydatif. Plus précisément, la survie des différentes souches a été testée après 30 minutes de croissance dans un milieu contenant 5 mM de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Tout d'abord, des précultures (triplicatas) de chacune des souches ont été préparées dans le milieu LB et elles ont été cultivées à 37°C durant environ 18 heures, avec agitation. Suite à cela, ces précultures ont subi des lavages qui consistaient à centrifuger et à resuspendre le culot bactérien avec du milieu LB ou du M63-glycérol frais. La D.O.<sub>600nm</sub> de chaque culture a été ajustée à 0,5 à un volume final de suspension bactérienne de 1 ml.

Chaque souche possède 9 tubes de réaction, soit 3 tubes par réplique biologique (triplicatas). Au temps « 0 minute », un volume de 50 µl de suspension bactérienne (10<sup>7</sup> CFU/ml) et un volume de 50 µl de solution de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (5 mM) ont été séquentiellement ajoutés à un tube de réaction contenant un volume de 900 µl de milieu à tester, soit le LB ou le M63-glycérol. Le tube de réaction a été mélangé par inversion entre chaque ajout pour permettre une bonne homogénéisation de la suspension bactérienne et de la solution oxydative dans le milieu. Plusieurs dilutions dans du PBS 0,9% ont ensuite été effectuées afin de faciliter le décompte bactérien par la suite. Le PBS est constitué de NaCl 154 mM, de KCl 2,7 mM, de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10,1 mM et de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,8 mM. Ensuite, un volume de 10 µl de chaque dilution, et ce en duplicata, a été mis sur gélose LB sous forme de goutte. La même procédure a été effectuée pour les triplicatas biologiques (9 tubes de réaction) de chaque souche et de chaque milieu. Les étapes de mélange au temps « 30 minutes » sont similaires à celles du temps initial. Toutefois, suite à l'homogénéisation, les tubes de réaction de chaque souche ont été mis en incubation à 37°C dans un bain-marie pendant 30 minutes.

Ensuite, des dilutions de chaque tube de réaction ont été effectuées, puis 10 µl ont été mis sous forme de goutte sur gélose LB. Finalement, les géloses pour chaque temps de réaction ont été mises à 30°C durant environ 18 heures d'incubation, puis le décompte de colonies bactériennes a été effectué.

Les résultats du dénombrement bactérien ont été mis sous forme d'histogrammes représentant le nombre de bactéries survivantes à « 30 minutes » par rapport au nombre de bactéries initialement présentes au temps « 0 minute » en présence de peroxyde d'hydrogène (pourcentage de survie totale).

### 2.10 Analyses LC-MS/MS

La quantification des sidérophores (l'entérobactine, les salmochélines et l'aérobactine) a été réalisée pour la souche CFT073 sauvage et les différents mutants dérivés (QT2230, QT2637 et QT2234) (Tableau 2.1; page 60). Tout d'abord, les souches ont été cultivées dans le milieu minimal M63-glycérol pendant 17 heures à 37°C, avec agitation. Les surnageants ont été récupérés, suite à une centrifugation, et ont été filtrés sur une membrane 0,2 µm. Des échantillons de 1 ml de surnageant ont été préparés dans 5% (v/v) d'acide formique et 0,12 ng/ml de 5, 6, 7, 8-tétradeutéro-3, 4-dihydroxy-2-heptylquinoline y ont été ajoutés comme contrôle interne. Des triplicatas ont été faits et chaque surnageant de culture de chaque souche a été analysé par LC-MS/MS (« *liquid chromatography-tandem mass spectrometry* »). Cette analyse a été performée en utilisant l'appareil de chromatographie liquide haute performance Agilent HP1100 (Mississauga, Ontario, Canada) couplé au spectromètre Micromass Quatroll (*Micromass Canada*). Les méthodes d'analyse et de quantification de chaque sidérophore sont celles décrites dans l'article de (Caza *et al.*, 2011).

### 2.11 Analyses statistiques

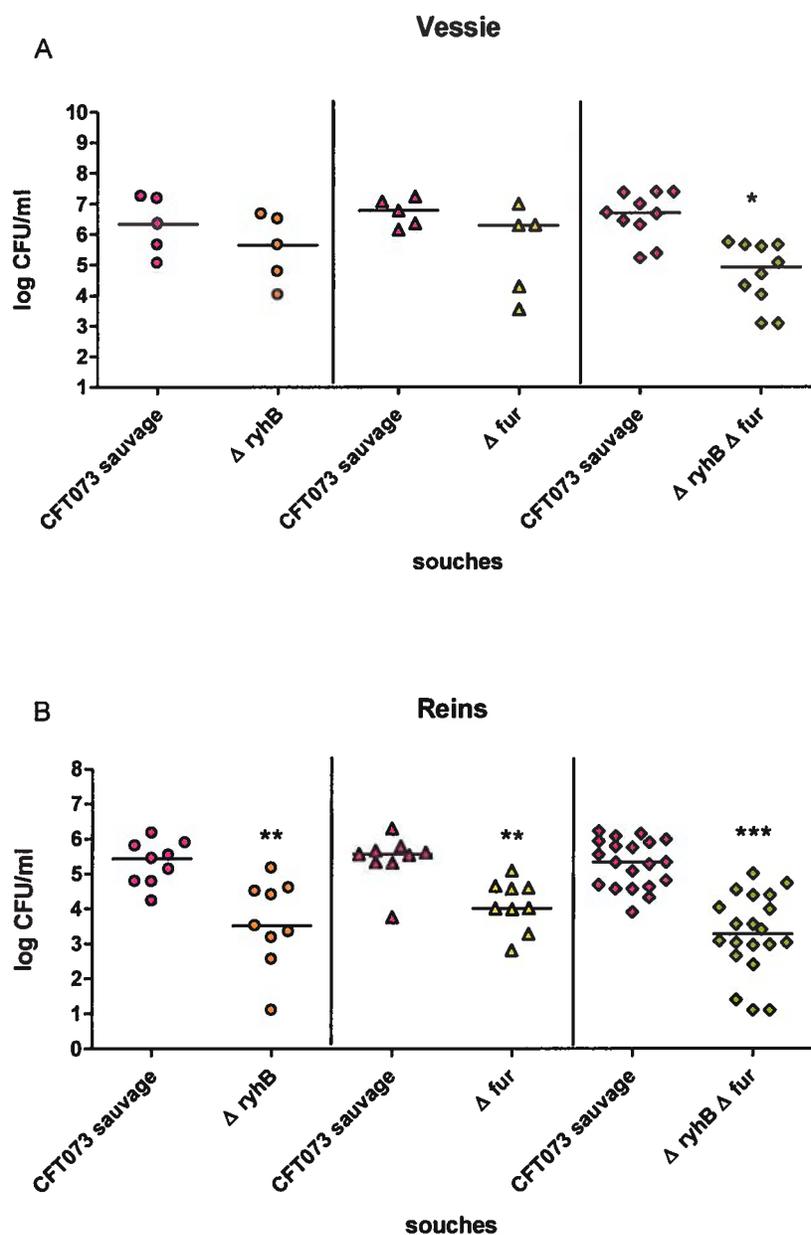
Tous les tests statistiques ont été exécutés à l'aide du logiciel *Prism4* (*GraphPad Software*). L'analyse des tests du stress oxydatif ainsi que de production de sidérophores a été effectuée à l'aide du test *Unpaired T*. Pour les résultats d'infections, le test du *Wilcoxon matched pairs* a été utilisé pour les co-infections et le test de *Mann-Whitney* pour les mono-infections.

### **Chapitre 3. Résultats**

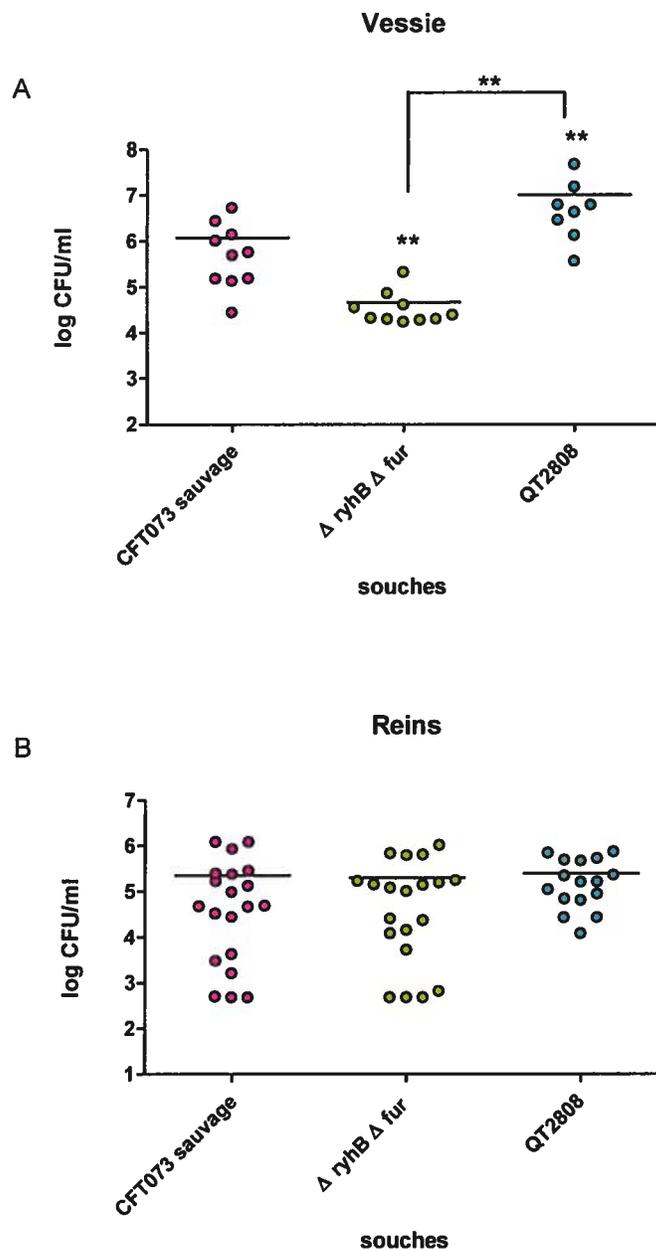
### 3.1 Infection du tractus urinaire de souris CBA/J

L'importance des régulateurs de fer, RyhB et Fur, pour la virulence de la souche uropathogène CFT073, a été étudiée chez la souris. De ce fait, les mutants dérivés de la souche ont été testés pour leur capacité à induire une infection du tractus urinaire murin, et ce, en utilisant la souche virulente CFT073  $\Delta lacZYA$  (QT1081) comme souche compétitrice. Son utilisation permet de faciliter l'observation des différences au niveau de la capacité d'infection des souches (Tableau 2.1; page 60). Le  $\log_{10}$  de CFU par ml d'homogénat de tissus de chaque souris, pour la souche sauvage et pour la souche mutée a été calculé pour chaque organe, soit la vessie et chacun des deux reins puis a été présenté sous forme d'un point dans le graphique de la Figure 3.1 (co-infections). Dans la vessie, seule la souche double mutante  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2240) présentait une atténuation après 48 heures post-infection en comparaison avec la souche compétitrice (CFT073 sauvage) ( $P = 0,00590$ ) (Figure 3.1A). En effet, il n'existe aucune différence significative entre la souche virulente et les souches mutantes suivantes :  $\Delta ryhB$  (QT2230) ( $P = 0,1250$ ) et  $\Delta fur$  (QT2237) ( $P = 0,0625$ ). Ceci révèle que les mutations combinées  $\Delta ryhB$  et  $\Delta fur$  ont des effets observables sur la virulence dans la vessie des souris contrairement aux mutations individuelles (Figure 3.1A). Toutefois, dans les reins, les trois souches mutantes sont atténuées après 48 heures post-infection en comparaison avec la souche virulente sauvage ( $\Delta ryhB$   $P = 0,0039$ ;  $\Delta fur$   $P = 0,0039$ ;  $\Delta ryhB \Delta fur$   $P < 0,0001$ ) (Figure 3.1B).

Du fait que la souche  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2240) soit la plus atténuée *in vivo*, la capacité de cette dernière à causer, seule, une infection dans le même modèle animal a donc été testée. En effet, l'importance des deux régulateurs de fer, RyhB et Fur, pour la virulence de la souche CFT073 chez le modèle murin d'infection urinaire ascendante, n'a jusqu'alors jamais été démontrée. Pour vérifier ce rôle combiné, une série de mono-infections a été exécutée, impliquant la souche  $\Delta ryhB \Delta fur$  en parallèle à la souche CFT073 sauvage. De plus, la souche complémentée QT2808 (CFT073  $\Delta ryhB \Delta fur$ ; *attTn7 :: fur, lac :: ryhB*) a aussi été utilisée pour le test afin de justifier le rôle propre des mutations aux effets observés. Les résultats obtenus pour le décompte bactérien dans la vessie et dans les reins de souris sont présentés dans la Figure 3.2 sous forme de CFU par ml d'homogénat de tissus.



**Figure 3.1 : Colonisation de la vessie (A) et des reins (B) de souris CBA/J co-infectées avec la souche virulente CFT073  $\Delta lacZYA$  (QT1081) et les mutants CFT073 dérivés. Les mutants CFT073 utilisés sont  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2237) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2240). Chaque point représente les décomptes bactériens dans l'organe d'une souris, prélevé après 48 h post-infection. Les reins ont été échantillonnés séparément (deux reins par souris). Ces résultats sont présentés sous forme de log<sub>10</sub> CFU par ml d'homogénat de tissus. La barre horizontale représente la médiane des logs CFU/ml. Les souches mutantes, statistiquement atténuées en comparaison (même symbole) de la souche  $\Delta lac$ , sont marquées par des astérisques (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ; \*\*\*,  $P < 0.0001$ ). Le test statistique utilisé est le *Wilcoxon matched pairs*.**

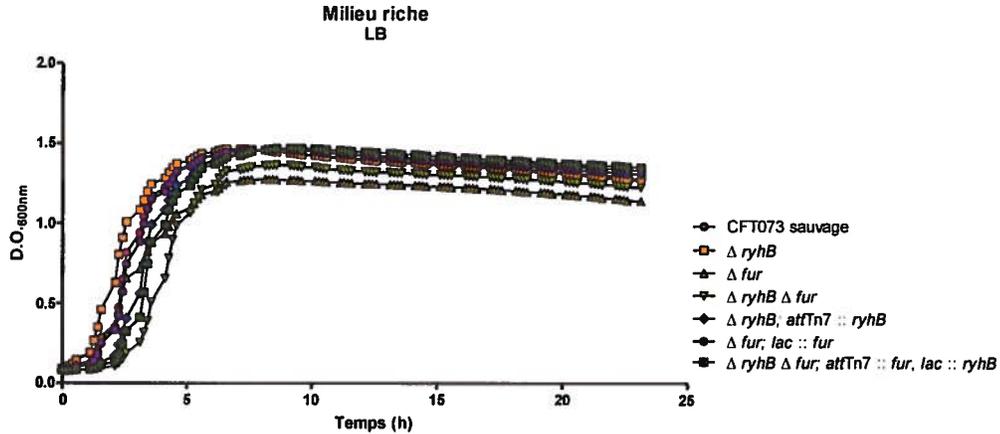


**Figure 3.2 : Colonisation de la vessie (A) et des reins (B) de souris CBA/J infectées avec la souche virulente CFT073, le mutant CFT073  $\Delta$  ryhB  $\Delta$  fur (QT2240) ou la souche complétée CFT073  $\Delta$  ryhB  $\Delta$  fur ; attTn7 :: fur, lac :: ryhB (QT2808). Chaque point représente les décomptes bactériens dans l'organe d'une souris, prélevé après 48 h post-infection. Les reins ont été échantillonnés séparément (deux reins par souris). Ces résultats sont présentés sous forme de log<sub>10</sub> CFU par ml d'homogénat de tissus. La barre horizontale représente la moyenne des logs CFU/ml. Les souches mutantes, statistiquement atténuées en comparaison de la souche CFT073  $\Delta$  lac, sont marquées par des astérisques (\*,  $P < 0.05$ ; \*\*,  $P < 0.005$ ). Le test statistique utilisé est le *Mann-Whitney*.**

Il est possible de constater que la souche  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2240) est uniquement atténuée dans la vessie ( $P = 0,0005$ ) et non dans les reins (Figure 3.2). De plus, dans la vessie, la souche complémentée (QT2808) regagne une capacité à infecter en comparaison avec la souche CFT073 sauvage et avec la souche double mutante ( $P < 0,0001$ ). Seulement 8 points (8 souris) pour la vessie et 16 points pour les reins sont observables pour la souche complémentée dans la Figure 3.2 car 2 souris sur 10 sont mortes avant l'autopsie (la cause de leur décès n'a pas pu être vérifiée, en raison qu'il n'y a pas eu de souris contrôles). En bref, les résultats des séries d'infection démontrent que la présence des deux régulateurs de fer est importante pour la virulence de la souche uropathogène chez la souris, car l'absence combinée de *ryhB* et *fur* affecte la capacité de la souche à causer une infection dans la vessie.

### 3.2 Courbes de croissance

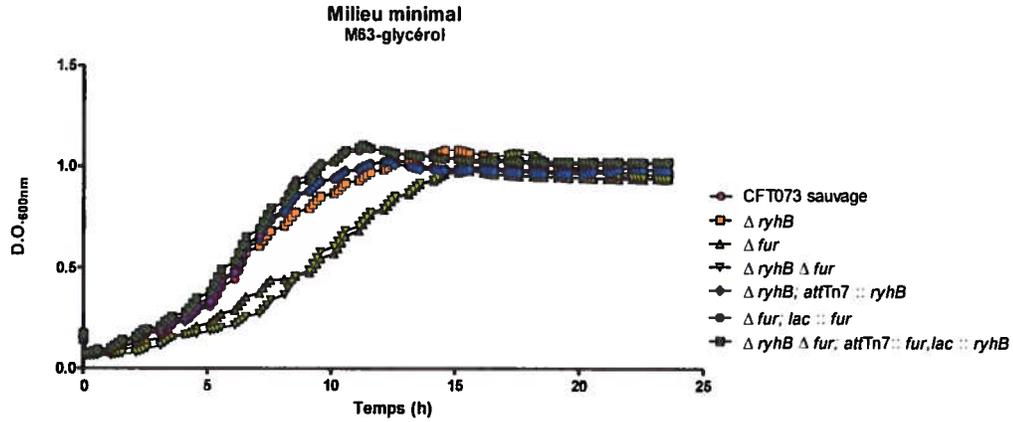
Afin de comprendre davantage les résultats obtenus *in vivo*, divers tests phénotypiques, attribuables à la virulence, ont été effectués. Tel que mentionné précédemment, le tractus urinaire est un milieu où le fer est en quantité limitée. Ainsi, les mutations *fur* et *ryhB* chez la souche uropathogène CFT073 ont été testées pour leurs effets sur la croissance dans différents milieux. Trois milieux ont été utilisés et les graphiques démontrant les courbes de croissance obtenues par *Bioscreen C* sont présentés dans les Figures 3.3 (le LB, milieu non défini), 3.4 (le M63-glycérol, milieu défini) et 3.5 (l'urine humaine). Tout d'abord, les mutants CFT073  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2637) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2634) démontrent une croissance rapide dans le LB. Celle-ci est reflétée par l'atteinte de la phase stationnaire après environ 8 heures d'incubation, à 37°C (Figure 3.3). Toutefois, il est important de constater que les mutants  $\Delta fur$  (D.O.<sub>600nm</sub> moyenne à 8 h = 1,28) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (D.O.<sub>600nm</sub> moyenne à 8 h = 1,36) possèdent un seuil de phase stationnaire légèrement plus faible que la souche sauvage (D.O.<sub>600nm</sub> moyenne à 8 h = 1,46).



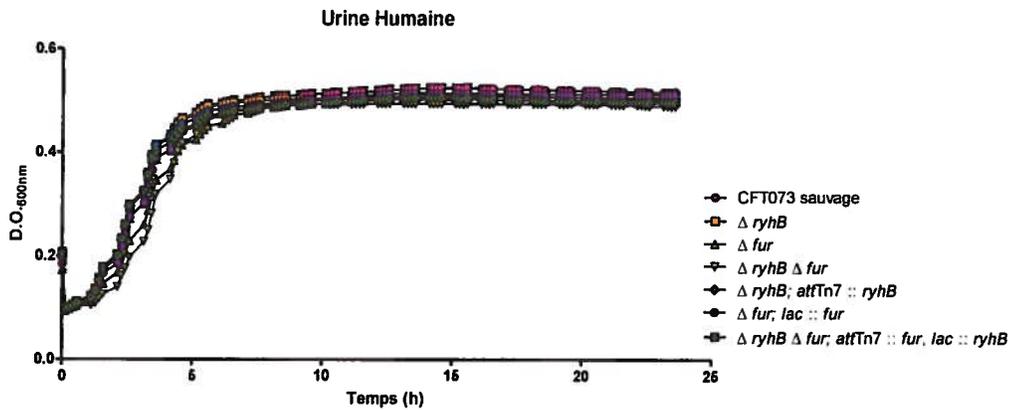
**Figure 3.3 : Courbes de croissance de la souche sauvage CFT073, des différents mutants dérivés et des souches complémentées, obtenues dans le milieu riche LB.** Les souches testées sont la souche sauvage CFT073, les mutants  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2637) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2634) ainsi que les souches complémentées CFT073  $\Delta ryhB; attTn7 :: ryhB$  (QT2469),  $\Delta fur; lac :: fur$  (QT2792) et  $\Delta ryhB \Delta fur; attTn7 :: fur, lac :: ryhB$  (QT2808). Les prises de D.O. à 600<sub>nm</sub> sont obtenues, à toutes les 15 minutes, grâce à l'appareil Bioscreen C, suite à une incubation sous agitation de 24 h à 37°C.

Ensuite, en comparaison avec le LB, l'aspect des courbes de croissance de la souche sauvage et celui des mutants dérivés démontre une croissance retardée dans le M63-glycérol, un milieu minimal limité en fer (Figure 3.4). Dans ce milieu, la perte de *fur* chez les souches  $\Delta fur$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$  a pour effet de retarder la croissance en comparaison avec la souche sauvage (Figure 3.4). Les souches complémentées contenant des mutations *fur* (QT2792 et QT2808) démontrent au contraire un regain de croissance semblable à la souche sauvage.

De plus, toutes les souches ont une courbe de croissance similaire dans l'urine humaine avec une atteinte rapide de la phase de croissance et de la phase stationnaire. Toutefois, leur D.O.<sub>600nm</sub> maximale est plus faible que celle dans les deux autres milieux (Figure 3.5).



**Figure 3.4 : Courbes de croissance de la souche sauvage CFT073, des différents mutants dérivés et des souches complémentées, obtenues dans le milieu minimal M63-glycérol.** Les souches testées sont la souche sauvage CFT073, les mutants  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2637) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2634) ainsi que les souches complémentées CFT073  $\Delta ryhB; attTn7 :: ryhB$  (QT2469),  $\Delta fur; lac :: fur$  (QT2792) et  $\Delta ryhB \Delta fur; attTn7 :: fur, lac :: ryhB$  (QT2808). Les prises de D.O. à 600 nm sont obtenues, à toutes les 15 minutes, grâce à l'appareil *Bioscreen C*, suite à une incubation sous agitation de 24 h à 37°C.

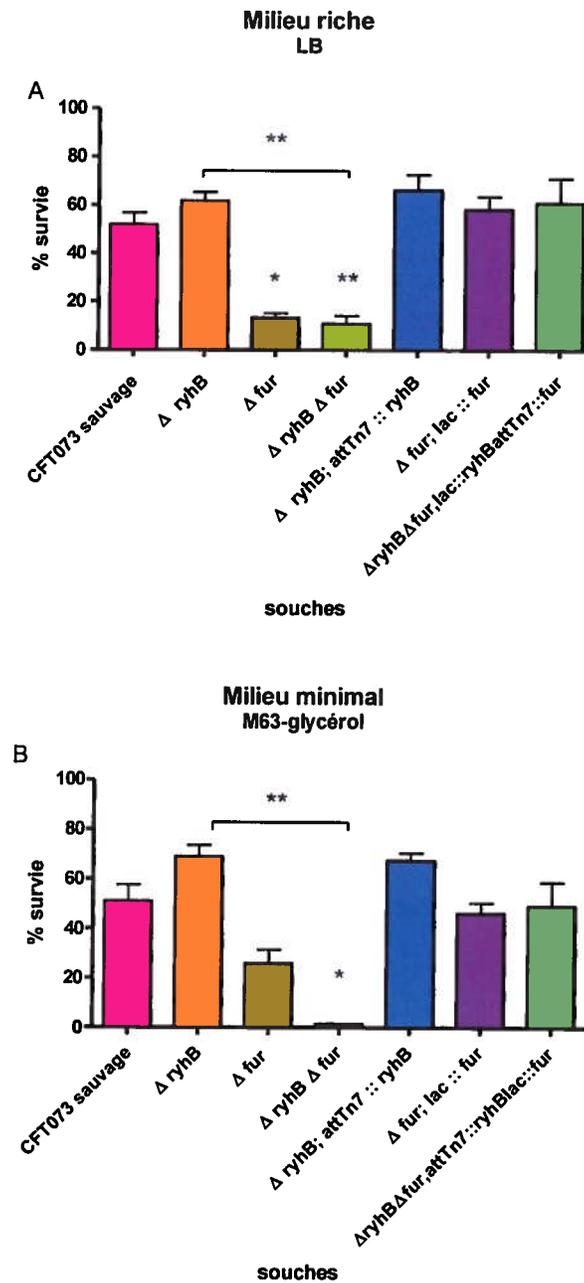


**Figure 3.5 : Courbes de croissance de la souche sauvage CFT073, des différents mutants dérivés et des souches complémentées, obtenues dans l'urine humaine.** Les souches testées sont la souche sauvage CFT073, les mutants  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2637) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2634) ainsi que les souches complémentées CFT073  $\Delta ryhB; attTn7 :: ryhB$  (QT2469),  $\Delta fur; lac :: fur$  (QT2792) et  $\Delta ryhB \Delta fur; attTn7 :: fur, lac :: ryhB$  (QT2808). Les prises de D.O. à 600nm sont obtenues, à toutes les 15 minutes, grâce à l'appareil *Bioscreen C*, suite à une incubation sous agitation de 24 h à 37°C.

Somme toute, l'absence individuelle et combinée des régulateurs de fer chez la souche uropathogène CFT073 lui permet tout de même de croître dans différents milieux de culture *in vitro*, mais la mutation *fur* ( $\Delta fur$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$ ) réduit considérablement sa croissance dans un milieu où la concentration en fer est limitée.

### 3.3 Test de survie au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

Afin de déterminer l'effet des mutations *fur* et *ryhB* sur la survie en présence d'un stress oxydatif, la souche sauvage CFT073 ainsi que les mutants dérivés (Tableau 2.1) ont été testés en présence de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), et ce, pour un temps déterminé de 30 minutes d'exposition. Les souches CFT073 mutantes sont  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2637) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2634) (Tableau 2.1). Deux milieux de culture ont aussi été utilisés : le LB (milieu riche) et le milieu minimal M63-glycérol (milieu minimal pauvre en fer) (Figure 3.6). Le pourcentage de survie par compte viable pour chacune des souches est présenté sous forme d'histogramme dans la Figure 3.6. Il représente la quantité de cellules bactériennes survivantes après 30 minutes d'exposition au peroxyde d'hydrogène (5 mM) en comparaison avec la quantité de cellules bactériennes présentes au début de l'exposition, soit au moment de l'ajout de l'agent oxydatif, à 0 minute. Il est important de noter que la quantité initiale, avant l'ajout du peroxyde d'hydrogène, était de 10<sup>7</sup>CFU par ml pour toutes les souches.



**Figure 3.6 : Pourcentage de survie bactérienne, suite à 30 minutes d'exposition au  $H_2O_2$  (5mM), de la souche sauvage CFT073, des mutants dérivés et des souches complémentées, dans le milieu riche LB (A) et le milieu minimal M63-glycérol (B).** Les souches testées sont la souche sauvage CFT073, les mutants  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2637) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2634) ainsi que les souches complémentées CFT073  $\Delta ryhB; attTn7 :: ryhB$  (QT2469),  $\Delta fur; lac :: fur$  (QT2792) et  $\Delta ryhB \Delta fur; attTn7 :: fur, lac :: ryhB$  (QT2808). Les différences statistiques entre la souche CFT073 sauvage et le mutant testé sont représentées par un ou des astérisques (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,005$ ). Le test statistique utilisé est le test *Unpaired T*.

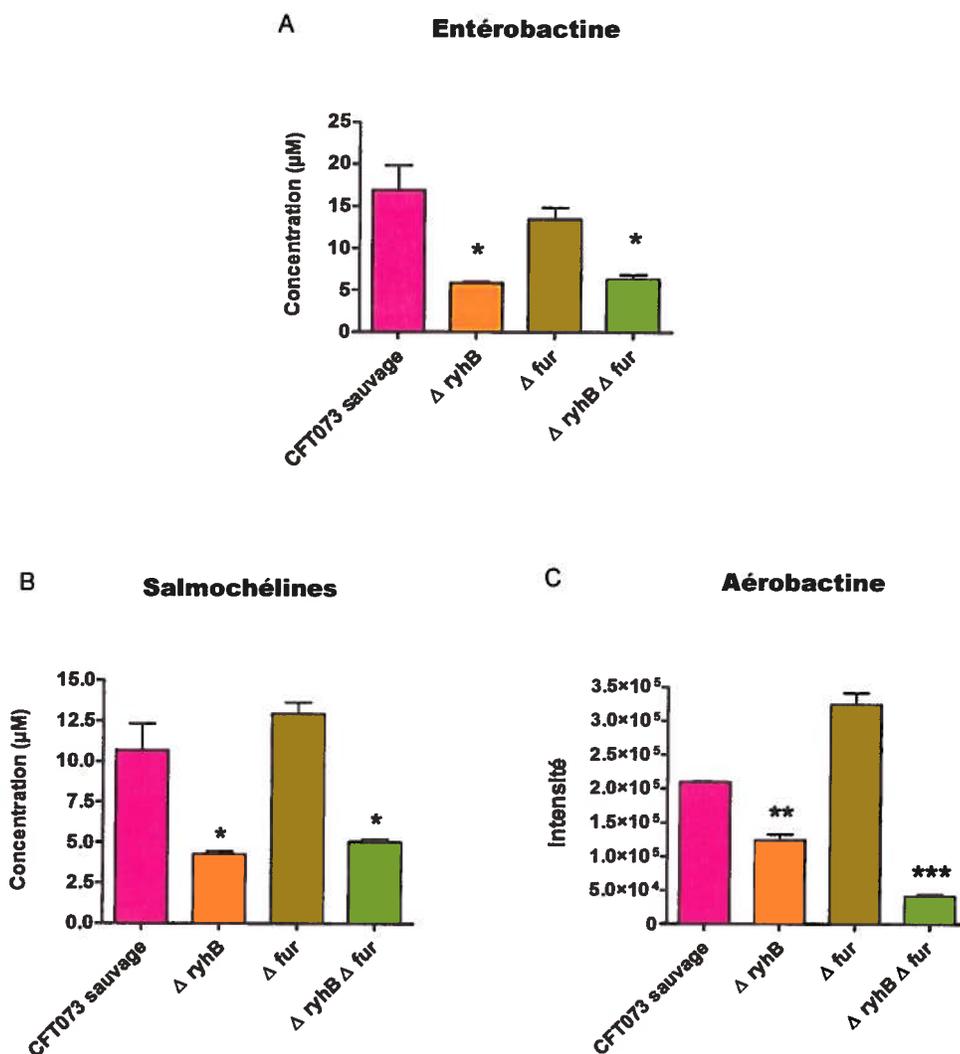
Tout d'abord, des phénotypes similaires sont observables dans les deux types de milieux pour la mutation individuelle *ryhB* (Figure 3.6). En effet, la perte de *ryhB* ( $\Delta$  *ryhB*) n'affecte pas significativement la sensibilité de la souche au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en comparaison de la souche sauvage. Toutefois, la perte individuelle de *fur* augmente la sensibilité de la souche à l'agent oxydatif dans le milieu LB. En effet, comparativement à la souche sauvage CFT073, la capacité de la souche mutante  $\Delta$  *fur* (QT2637) à survivre dans un milieu riche en fer contenant du H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est significativement diminuée après seulement 30 minutes d'exposition (LB,  $P = 0,0055$ ) (Figure 3.6A). En milieu minimal, la survie de cette souche est aussi diminuée, mais la différence n'est pas statistiquement significative. L'absence additionnelle de *ryhB* chez le double mutant diminue modérément la capacité de la souche à survivre dans le LB et diminue drastiquement la survie de la souche dans le milieu pauvre en fer, M63-glycérol (LB,  $P = 0,0043$ ; M63-g.,  $P = 0,0088$ ) (Figure 3.6). De plus, le mutant  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur* est significativement plus sensible que le mutant  $\Delta$  *ryhB* dans les deux milieux de croissance (LB,  $P = 0,0024$ ; M63-g.,  $P = 0,0049$ ) démontrant que la mutation additionnelle  $\Delta$  *fur* contribue en grande partie à la sensibilité de la souche. De plus, la complémentation des allèles *ryhB* et *fur* chez les souches mutées permet la restauration de la survie bactérienne au même titre que celle de la souche sauvage, associant ainsi les effets observés aux mutations spécifiques (QT2469, QT2792 et QT2808 de la Figure 3.6). En conclusion, l'absence combinée des régulateurs Fur et RyhB affecte négativement la survie de la souche uropathogène CFT073 en présence de peroxyde d'hydrogène, démontrant ainsi leur implication cumulative dans la sensibilité au stress oxydatif.

### 3.4 La production de sidérophores

Les sidérophores sont utiles pour la bactérie afin qu'elle acquiert le fer nécessaire à sa survie dans diverses niches biologiques. Tel que mentionné précédemment, ces systèmes de chélation sont considérés comme un facteur de virulence pour plusieurs entérobactéries. Afin d'établir un rapport entre les résultats obtenus *in vivo* et les mécanismes sous-jacents, régulés par Fur et RyhB, il est intéressant d'étudier la capacité de production des trois types de sidérophores de la souche uropathogène CFT073 qui est mutée au niveau des régulateurs globaux de

l'homéostasie du fer. Les sidérophores ont été quantifiés directement des surnageants des cultures de la souche sauvage CFT073 et des souches mutées dérivées :  $\Delta ryhB$  (QT2230),  $\Delta fur$  (QT2637) et  $\Delta ryhB \Delta fur$  (QT2634) (Tableau 2.1; page 60). Il est important de mentionner que les souches complémentées n'ont pas été testées à ce niveau. De plus, les souches ont poussé dans le milieu minimal M63-glycérol afin de favoriser la production de sidérophores. Les résultats sont présentés dans la Figure 3.7, sous forme d'histogrammes démontrant la quantité ou le pourcentage relatif de chaque type de sidérophore.

Par comparaison avec la souche sauvage CFT073, le mutant  $\Delta ryhB$  produit significativement moins de sidérophores. En effet, il produit 2,9 fois moins d'entérobactine ( $P = 0,0212$ ), 2,5 fois moins de salmochélines ( $P = 0,0182$ ) et 1,7 fois moins d'aérobactine ( $P = 0,0007$ ) (Figure 3.7). Le mutant  $\Delta fur$  n'a aucune différence significative avec la souche sauvage au niveau de la production de l'entérobactine ( $P = 0,3564$ ) et des salmochélines ( $P = 0,2788$ ), mais la production d'aérobactine est légèrement augmentée de 1.6 fois ( $P = 0,0024$ ) (Figure 3.7A.C.). Ces résultats sont attendus car chez la souche sauvage, le gène *fur* est peu ou pas activé dans un milieu pauvre en fer, ce qui permet l'expression des gènes codant pour les sidérophores. Ce phénotype est donc aussi observable chez la souche  $\Delta fur$ , car le régulateur *y* est absent. Une double mutation au niveau des gènes *ryhB* et *fur* ( $\Delta ryhB \Delta fur$ ) ramène statistiquement à une plus faible production de sidérophores en comparaison avec la souche sauvage et avec la souche  $\Delta fur$  (Figure 3.7). En effet, le double mutant produit 2,7 fois moins d'entérobactine ( $P = 0,0255$ ), 2,1 fois moins de salmochélines ( $P = 0,0274$ ) et 5,1 fois moins d'aérobactine ( $P < 0,0001$ ) que la souche sauvage (Figure 3.7). Somme toute, une mutation au niveau de *ryhB* réduit la capacité de la souche uropathogène CFT073 à produire les trois types de sidérophores dans un milieu minimal, *in vitro*.



**Figure 3.7 : Quantification (µM) des molécules d'entérobactine (A) et de salmochélines (B) et quantification absolue selon l'aire sous la courbe de l'aéro bactéine (C), de la souche sauvage CFT073 et des différents mutants dérivés. Les mutants CFT073 utilisés sont ΔryhB (QT2230), Δfur (QT2237) et ΔryhB Δfur (QT2240). Les quantifications des différents sidérophores ont été obtenues par spectrométrie de masse (LC-MS/MS). Les différences statistiques entre la souche CFT073 sauvage et le mutant testé sont représentées par un ou des astérisques (\*,  $P < 0,05$ ; \*\*,  $P < 0,005$ ; \*\*\*,  $P < 0,0001$ ). Le test statistique utilisé est le test *Unpaired T*.**

## Chapitre 4. Discussion

#### 4.1 Infection du tractus urinaire de souris CBA/J

Le principal objectif du projet était d'étudier les rôles des régulateurs de l'homéostasie du fer, Fur et RyhB, au niveau de la virulence des souches d'*E. coli* causant des infections extra-intestinales. Plus précisément, leurs rôles ont été caractérisés chez la souche *E. coli* uropathogène CFT073 (O6:H1:K2) qui cause des infections du tractus urinaire chez les mammifères. Celle-ci a été initialement isolée du sang d'une patiente souffrant d'une pyélonéphrite aiguë et hospitalisée à l'hôpital de l'Université du Maryland (Mobley *et al.*, 1990). Cette souche a aussi été entièrement séquencée en 2002, ce qui fait d'elle un choix d'autant plus judicieux pour l'étude (Welch *et al.*, 2002).

Suite à la génération des différentes souches mutantes dérivées de la souche CFT073 ( $\Delta$  *ryhB*,  $\Delta$  *fur* et  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*), l'étude de leur virulence a été entamée en utilisant le modèle du tractus urinaire ascendant murin. Ce modèle a été le sujet de divers projets antérieurs qui ont démontré son efficacité quant à l'étude de la virulence de la souche UPEC CFT073. Ainsi, deux sortes de séries d'infections ont été effectuées afin d'étudier les rôles des régulateurs de fer dans la pathogenèse de la souche : les co-infections et les mono-infections. La procédure et le but de chaque expérience sont différents. En effet, la série de co-infections a servi à tester la capacité des souches mutantes (déficientes pour un ou deux systèmes de régulation du fer) à faire compétition à la souche sauvage dans les différents organes du tractus urinaire, soient la vessie et les reins. En revanche, la série de mono-infections a servi à étudier la capacité d'une souche isolée à causer une infection, dans le modèle d'infection.

Tout d'abord, il était important de vérifier le nombre initial à injecter aux souris afin de pouvoir le comparer avec celui après infection. Cette étape de vérification a aussi permis d'affirmer que les deux souches mises en compétition, pour chaque série, étaient initialement présentes en quantité équivalente. L'inoculum de départ contenait ainsi un nombre égal de cellules bactériennes de chaque souche à tester, soient la souche sauvage CFT073  $\Delta$  *lac* et les mutants dérivés. Il est important de noter que la souche témoin utilisée, ne possédant pas le gène *lac*, a déjà été préalablement testée pour sa capacité à causer une infection. En effet, des séries d'infections effectuées au sein d'études antérieures ont permis d'établir qu'il n'existe aucune différence observable quant à la virulence entre la souche sauvage CFT073 et

la souche isogénique CFT073  $\Delta lac$ . Celle-ci a donc été utilisée pour les étapes ultérieures de l'expérience afin de faciliter le dénombrement bactérien des souches mutantes, sur gélose MacConkey, pour les séries de co-infections. De plus, il était important de procéder à des contrôles de stérilité. Ceux-ci consistaient à prélever l'urine de souris avant l'infection afin de vérifier qu'il n'y avait aucune infection préalable chez les souris et à échantillonner les surfaces de chaque organe au cours de l'autopsie afin de vérifier qu'elles n'avaient pas développé de septicémie. En effet, les deux cas auraient pu fausser les résultats du dénombrement bactérien.

Une série de co-infections pour chaque mutant, avec la souche CFT073  $\Delta lac$ , a donc été testée et un dénombrement bactérien parallèle a été obtenu dans chaque organe de souris récolté après 48 heures d'infection. Tel que mentionné précédemment, aucune différence significative au niveau de la capacité à faire compétition à la souche sauvage dans la vessie de souris n'a été observée pour les souches simples mutantes,  $\Delta ryhB$  et  $\Delta fur$  (Figure 3.1A; page 79). Toutefois, une double mutation ( $\Delta ryhB \Delta fur$ ) amenait à une atténuation de la souche en comparaison avec la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que la perte combinée des régulateurs de fer a un effet important sur la capacité de la souche à coloniser la vessie de souris. L'absence d'une régulation par le régulateur global Fur ainsi que par le petit ARN non codant RyhB provoquerait ainsi un débalancement quant à l'acquisition, à l'entreposage et à l'utilisation du fer par la souche mutante. Cette dérégulation aurait un effet négatif sur la souche, car elle est moins en mesure de causer une infection aussi efficace que la souche sauvage. Toutefois, il est important de noter que dix souris ont été allouées pour l'étude de la souche double mutante et cinq pour les souches simples mutantes. De ce fait, les différences statistiques sont plus évidentes. Le nombre de souris a donc un effet important sur les résultats obtenus. Il est ainsi possible de constater une légère tendance à l'atténuation des souches simples mutantes dans la vessie de souris. Si un plus grand nombre de souris avait été alloué pour chaque série de mutants, il aurait été peut-être possible de constater une différence statistiquement significative et ainsi, probablement, d'affirmer qu'une perte individuelle de chaque régulateur de fer a un impact négatif sur la colonisation bactérienne dans la vessie de souris. Dans la même optique, il est aussi important de considérer les différences statistiques qui sont plus évidentes pour les résultats des reins (2 par souris) que pour ceux de la vessie (1 par souris). Ainsi,

pour ce qui est des reins de souris, les trois souches mutantes présentaient un défaut de compétition avec la souche sauvage (Figure 3.1B; page 79). Ceci pourrait être expliqué par le fait que les reins sont des organes très vascularisés, ce qui amènerait à une infiltration des cellules du système immunitaire et une exposition plus élevée aux métabolites oxydatifs (Sabri *et al.*, 2009). Ces facteurs contribueraient ainsi à un environnement moins propice à la croissance bactérienne des souches déficientes pour un ou deux systèmes de régulation de fer, mises en compétition pour des nutriments et pour la survie avec une souche sauvage, qui elle, en revanche, possède une régulation de l'homéostasie du fer adéquate.

Du fait que la souche double mutante ( $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*) présentait un plus grand défaut de compétition dans les deux types d'organes, elle a ensuite été testée pour sa capacité à causer, seule, une infection dans le modèle du tractus urinaire murin. De ce fait, des séries de mono-infections ont été effectuées en utilisant comme souches de contrôle la souche sauvage CFT073 ainsi que la souche double mutante complémentée QT2808 (CFT073  $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*; *attTn7* :: *fur*, *lac* :: *fur*) (Figure 3.2; page 80). Tel que mentionné précédemment, la souche double mutante présentait une atténuation dans la vessie de souris, mais aucune différence significative dans les reins. Ces résultats sont intéressants, car ils démontrent que la présence des deux régulateurs de fer favorise la capacité de la souche uropathogène à coloniser la vessie et à engendrer une cystite. Une perte combinée de Fur et RyhB aurait ainsi un impact négatif sur la virulence de CFT073. Ces résultats viennent donc appuyer l'idée que la régulation des systèmes d'acquisition, d'entreposage et d'utilisation de fer effectuée par ces deux régulateurs de l'homéostasie du fer joue un rôle important dans la pathogenèse des souches UPEC. En revanche, la souche double mutante était toujours en mesure de coloniser les reins de souris au même titre que la souche sauvage (Figure 3.2B). Les mécanismes de régulation du fer contrôlés par les deux régulateurs à l'étude ne semblent donc pas vitaux dans ces organes, car la souche serait toujours en mesure de causer une pyélonéphrite. En d'autres mots, l'absence combinée de Fur et RyhB n'atténue pas la souche dans sa capacité à infecter les reins. Il est possible de croire que lorsque la souche uropathogène atteint les reins, elle utilise des facteurs de virulence plus appropriés au lieu d'infection ainsi que des systèmes d'acquisition du fer indépendants d'une régulation concertée de Fur et RyhB. Il se pourrait aussi que la perte simultanée des deux régulateurs avantage d'une manière équitable la souche,

quant à sa survie, par le biais d'une ou plusieurs interactions avec le milieu, lui permettant ainsi d'être toujours en mesure de causer une infection dans les reins de souris. Il serait donc intéressant de tester les mutants simples de manière individuelle afin d'étudier séparément les rôles que joue Fur ou RyhB dans la virulence de la souche UPEC au sein du modèle animal utilisé.

Divers tests phénotypiques, attribuables à la virulence et qui ont été effectués préalablement, pourront expliquer davantage les résultats obtenus *in vivo*. Ces tests ont permis d'étudier la croissance dans différents milieux, la production de sidérophores et la capacité de survie en présence d'un stress oxydatif des différents mutants CFT073 dérivés. Tel que mentionné précédemment, ces trois volets ont été identifiés comme important pour la virulence de plusieurs souches pathogènes et ils sont étroitement liés aux régulateurs Fur et RyhB; telles sont les raisons de leurs études chez la souche ExPEC.

#### 4.2 Courbes de croissance

Tout d'abord, il a été nécessaire d'étudier le comportement des souches mutantes dans différents milieux de culture *in vitro* en comparaison avec la souche sauvage et les souches complémentées. Les résultats sont présentés dans les Figures 3.3, 3.4 et 3.5 (pages 82 et 83). Ceux-ci regroupent les phénotypes de croissance observés pour les mutants CFT073 dérivés ( $\Delta fur$ ,  $\Delta ryhB$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$ ) et pour les souches complémentées ( $\Delta fur$ ;  $lac :: fur$ ,  $\Delta ryhB$ ;  $attTn7 :: ryhB$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$ ;  $attTn7 :: fur$ ,  $lac :: ryhB$ ) en parallèle avec la souche sauvage CFT073. Ainsi, trois milieux de croissance ont été utilisés pour l'expérience. Tout d'abord, le milieu riche en fer et non défini, le LB, ainsi que le milieu minimal pauvre en fer et défini, le M63-glycérol, ont été choisis afin d'étudier les effets de différentes concentrations extracellulaires de fer sur une souche UPEC déficiente pour un ou deux systèmes de régulation du fer (Fur et/ou RyhB). Ensuite, en raison du fait que la souche utilisée pour l'étude est une souche uropathogène, il a aussi été intéressant d'étudier la croissance des mutants dans l'urine humaine.

Les résultats obtenus dans le LB présentent des courbes de croissance similaires pour tous les mutants testés et pour toutes les souches complémentées

(Figure 3.3; page 82). Toutefois, il est important de noter que le mutant  $\Delta ryhB \Delta fur$  présente un très léger retard de croissance en comparaison des autres souches et présente, tout comme la souche  $\Delta fur$ , une D.O.<sub>600nm</sub> de phase stationnaire légèrement plus faible que la souche sauvage. Des résultats similaires ont déjà été observés chez la souche *E. coli* K-12 mutée au niveau du gène *fur* (Jacques *et al.*, 2006). En effet, ce mutant présentait un défaut de croissance dans le milieu LB. Ceci était justifié par le fait que l'absence du régulateur amenait à élever la concentration intracellulaire en fer, ce qui, par conséquent, causait des effets négatifs sur la croissance de la souche mutée (Jacques *et al.*, 2006). Il est aussi important de constater que la souche double mutante complémentée ( $\Delta ryhB \Delta fur$ ; attTn7 :: *fur*, *lac* :: *ryhB*) ne possédait plus ce défaut de croissance, confirmant que les effets observés sont uniquement dus à l'absence des régulateurs. De plus, le petit ARNnc RyhB ne semblait pas affecter de façon majeure la croissance de CFT073, dans un milieu où la concentration extracellulaire en fer est élevée, car son absence au niveau de la souche double mutante n'amenait pas une différence significative du phénotype de croissance de la souche comparativement à celle du mutant  $\Delta fur$ .

Puis, les mutants ont été testés pour leur capacité à croître dans le M63-glycérol, un milieu minimal et pauvre en fer (Figure 3.4; page 83). Dans ce type de milieu, la protéine Fur devrait être peu ou pas activée car le fer, son co-répresseur, y est limité. Le modèle de régulation chez *E. coli* K-12 stipule que l'expression de *ryhB* serait activée en absence de Fur. Ceci a pour conséquence de réprimer la production de protéines non essentielles qui stockent le fer et donc d'augmenter la quantité de fer libre disponible dans la bactérie. De ce fait, chez un mutant  $\Delta ryhB$ , l'effet contraire serait observé : la concentration intracellulaire de fer libre et disponible diminuerait (Masse et Gottesman, 2002; Jacques *et al.*, 2006). Cependant, l'acquisition du fer extracellulaire, quoique faible, est encore possible chez cette souche mutante, car Fur y est présent. Dans notre cas, malgré le fait que le mutant CFT073  $\Delta ryhB$  ait une D.O.<sub>600nm</sub> légèrement plus faible que la souche sauvage après 8 heures de croissance, il pousse relativement bien dans le M63-Glycérol, contrairement à ce qui a été observé chez le modèle *E. coli* K-12 proposé (Figure 3.4; page 83). De plus, parmi les souches testées dans le M63-glycérol, les mutants  $\Delta fur$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$  sont ceux qui présentaient le plus grand retard de croissance en comparaison avec la souche sauvage. Ceci peut être expliqué par le fait que la protéine Fur, qui est un régulateur

global chez *E. coli*, réprime plusieurs gènes impliqués dans l'acquisition du fer, mais aussi dans le métabolisme cellulaire, qui n'ont pas de fonctions directement liées au fer, par exemple la respiration, la glycolyse, la synthèse d'ADN, etc. (Andrews *et al.*, 2003; de Lorenzo *et al.*, 2004). Ainsi, en plus d'être dans un milieu où les nutriments sont minimaux, l'absence de *fur* amène à une dérégulation de plusieurs réactions biologiques chez la bactérie, ce qui causerait probablement une croissance retardée chez les deux souches mutantes ( $\Delta fur$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$ ). Une étude, effectuée chez *E. coli* K-12, a stipulé que l'observation de ce phénotype chez le mutant  $\Delta fur$  était aussi due à l'expression constitutive de RyhB, car Fur n'est plus présent pour permettre l'inactivation du petit ARNnc (Jacques *et al.*, 2006). Ainsi, il serait logique de penser qu'une souche double mutante amènerait à une restauration complète de la croissance de la souche. Toutefois, ceci n'est pas observé pour la souche CFT073. En effet, la mutation *ryhB* semble avoir moins d'impact qu'une mutation *fur* au niveau de la croissance, car le déficit de croissance observé chez le mutant  $\Delta fur$  n'est pas corrigé par la perte additionnelle de *ryhB* chez le double mutant ( $\Delta ryhB \Delta fur$ ). En d'autres mots, il semblerait qu'une mutation additionnelle de *ryhB* ( $\Delta ryhB \Delta fur$ ) ne viendrait pas avantager ou affecter la souche au niveau de sa croissance en comparaison avec le mutant simple  $\Delta fur$ . Ceci peut s'expliquer par le fait que dans le milieu minimal, chez la souche double mutante, la mutation *fur* permettrait constitutivement l'acquisition de fer extracellulaire et la mutation *ryhB* permettrait, en plus, le stockage du fer disponible dans la bactérie. Par conséquent, un manque de régulation au niveau de la concentration intracellulaire du fer dans la cellule, et ce dans un milieu où le fer est peu disponible, provoquerait un déséquilibre cellulaire au début de la phase de croissance quant à l'utilisation du métal par des protéines essentielles. Ainsi, le métabolisme cellulaire de la souche serait ralenti, ce qui provoquerait un déficit de croissance pendant les premières heures, puis la bactérie atteindrait probablement un certain équilibre intracellulaire et extracellulaire qui lui permettrait de survivre et de croître dans ce milieu (atteinte de la phase stationnaire au même titre que les souches mutantes simples et que la souche sauvage). En revanche, une mutation individuelle de *ryhB* ne semble pas être suffisante pour provoquer ce déséquilibre et pour causer à elle seule un retard de croissance. Le ralentissement observé pourrait donc désavantager les mutants  $\Delta fur$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$  dans leur capacité à s'établir au début de la phase d'infection, soit au niveau de la vessie. Ceci pourrait ainsi expliquer en partie leur atténuation en co-infection et en mono-infection dans la vessie de souris

(Figures 3.1 et 3.2; pages 79 et 80). En bref, la quantité de fer intracellulaire chez la souche CFT073 est régulée de concert par les deux régulateurs, Fur et RyhB. En revanche, RyhB, quoique important pour une croissance optimale, n'est pas essentiel à la survie de la souche dans un milieu pauvre en fer, *in vitro*.

Finalement, l'urine humaine a aussi été utilisée comme milieu de croissance, car la souche sauvage CFT073 est une souche uropathogène (Figure 3.5; page 83). Ainsi, il est important de tester la capacité des mutants à croître dans l'urine humaine. Une étude transcriptomique sur la souche CFT073, isolée directement de l'urine de souris CBA/J infectées, a permis de définir les conditions environnementales que rencontre une souche uropathogène durant une infection du tractus urinaire. Le groupe de recherche a pu établir que, sur la base du niveau d'expression génique, le tractus urinaire semble être un milieu pauvre en fer et en azote et modérément oxygéné (Snyder *et al.*, 2004). De ce fait, les systèmes d'acquisition de fer, tels que les sidérophores, sont activés chez la souche pathogène et la régulation de la défense contre un stress oxydatif est en alerte. Malgré la faible biodisponibilité des nutriments, il a été démontré que la souche *E. coli* a la capacité d'acquérir des quantités suffisantes de fer et d'azote afin de maintenir une bonne croissance dans l'urine (Snyder *et al.*, 2004; Hagan *et al.*, 2010). De plus, une autre étude a stipulé que l'habileté de croître dans l'urine humaine ne semble pas être en corrélation avec l'habileté de coloniser le tractus urinaire, puisqu'autant de souches *E. coli* entéropathogènes, entérohémorragiques et fécales testées étaient en mesure de pousser adéquatement dans ce milieu (Alteri *et al.*, 2009). Toutefois, l'urine utilisée pour le test de cette étude est filtrée contrairement à l'urine *in vivo*. De ce fait, ce milieu ne contenait pas de métabolites oxydatifs, car les cellules immunitaires de l'hôte qui les produisent y sont absentes. Les résultats obtenus dans l'urine humaine *ex vivo* présentaient ainsi une bonne croissance pour tous les mutants testés en comparaison avec CFT073, malgré l'absence d'un ou des deux régulateurs de l'homéostasie du fer, soit Fur ou RyhB.

#### 4.3 Test de survie bactérienne au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)

En second lieu, il a été important de tester la survie des différents mutants, des souches complémentées et de la souche sauvage CFT073, en présence d'un stress oxydatif. En effet, dès le début de la phase d'infection, la souche uropathogène est confrontée au système immunitaire de l'hôte, dont les leucocytes polymorphonucléaires. Ces derniers jouent un rôle prédominant dans la défense innée et ce, en éliminant les pathogènes via la génération d'espèces réactives de l'oxygène dommageables ainsi que par le relâchement de peptides antimicrobiens. De plus, ces leucocytes sont des médiateurs de la réponse inflammatoire et jouent un rôle relationnel avec d'autres types cellulaires du système immunitaire. De ce fait, pour que la souche uropathogène ait la capacité de coloniser et de causer la maladie, elle doit être en mesure de contrer les barrières de protection du tractus urinaire ou de posséder des moyens pour s'en échapper.

Le test de survie en présence d'un stress oxydatif lié au fer a ainsi été effectué, chez la souche uropathogène CFT073, afin de caractériser le rôle des régulateurs de fer, Fur et RyhB, dans la défense contre le stress oxydatif et de mieux comprendre la relation qu'ils peuvent avoir avec le tractus urinaire lors d'une infection. Pour ce faire, un dénombrement bactérien reflétant la survie des souches après 30 minutes d'exposition à un agent oxydatif, le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), a été effectué dans deux milieux différents, de façon à étudier aussi l'effet de différentes concentrations de fer sur les mutations : le LB, un milieu riche, et le M63-glycérol, un milieu pauvre en fer (Figure 3.6; page 85). La concentration d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et le temps d'exposition ont été sélectionnés à l'appui de diverses études antérieures faites chez *E. coli* et chez d'autres bactéries Gram négatives (Demple *et al.*, 1983; Asad et Leitao, 1991; Imlay et Linn, 1987; Asad *et al.*, 1997; Tseng *et al.*, 2001; Tree *et al.*, 2008). En effet, il a été démontré que l'exposition d'*E. coli* à de faibles concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, allant de 1 mM jusqu'à 3 mM, induirait une réponse adaptative, qui se définit par l'activation de plus de 30 protéines et qui impliquerait deux systèmes de protection importants : la protéine OxyR, qui combat le stress oxydatif, et la réponse SOS, qui promeut la réparation de l'ADN (Imlay et Linn, 1987; Asad *et al.*, 1997). De ce fait, ces faibles concentrations amèneraient la bactérie à activer ces mécanismes qui lui permettraient par la suite de résister à de futures expositions croissantes d'agent réactif. Une concentration de plus de 3 mM a été déterminée comme appropriée pour passer au

deuxième mode de destruction bactérienne, qui impliquerait des dommages autres que ceux de l'ADN, et qui affecterait la survie bactérienne. Afin d'étudier la survie réelle de la souche à une dose d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, et sans qu'aucun mécanisme de résistance bactérienne n'ait été enclenché au départ chez la bactérie, une dose de 5 mM a ainsi été utilisée. De plus, un court temps d'observation de 30 minutes a été employé afin de permettre un décompte bactérien adéquat et différentiel entre les différentes souches.

Tout d'abord, les résultats démontrent que Fur jouerait un rôle important pour la défense contre le stress oxydatif chez la souche CFT073, car la mutation *fur* augmente la sensibilité au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Figure 3.6; page 85). En effet, malgré que Fur soit peu activé, un effet dû à son absence dans le M63-glycérol est observé (milieu minimal pauvre en fer). Les résultats sont toutefois prévisibles, car des études antérieures chez *E. coli* K-12 ont démontré que l'expression de *fur* est activée par les deux régulateurs majeurs de la réponse au stress oxydatif : OxyR et SoxRS (Zheng *et al.*, 1999; Andrews *et al.*, 2003). Ces derniers sont activés par des hauts niveaux de métabolites d'oxygène tels que l'anion superoxyde (O<sup>2-</sup>) et le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), qui, en interagissant avec le fer, engendre un radical libre hautement dommageable pour la cellule : le radical hydroxyle (OH<sup>·</sup>). Ainsi, lors d'une détection de stress oxydatif, OxyR et SoxRS sont activés et, à leur tour, augmentent l'expression de *fur*. Ce dernier réprime, par la suite, les gènes d'acquisition du fer et régule son homéostasie dans la cellule. Donc la mutation *fur* contribuerait à augmenter la concentration intracellulaire en fer libre, ce qui a comme conséquence directe de hausser le niveau de stress oxydatif dans la cellule et de diminuer la résistance de la bactérie à l'agent réactif.

Touati et ses collaborateurs ont aussi démontré que la dérégulation de l'homéostasie en fer observée chez une souche d'*E. coli* mutée au niveau du gène *fur* pouvait être corrigée par une surexpression du gène codant pour la ferritine, une protéine d'entreposage bactérienne du fer (*fina*) (Touati *et al.*, 1995). En effet, la ferritine est responsable de la majorité de l'entreposage ferrique chez *E. coli* (plus de 50% de l'entreposage) (Abdul-Tehrani *et al.*, 1999). De plus, selon le modèle de la régulation ferrique de RyhB chez *E. coli*, la production des protéines d'entreposage du fer, lors de conditions de carence en fer, est inhibée par le petit ARN non-codant. Il est donc logique de supposer que l'absence additionnelle de *ryhB* chez le double mutant ( $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*) viendrait balancer la concentration intracellulaire en fer chez le mutant

*fur* et, de ce fait, diminuerait sa sensibilité au stress oxydatif (Masse et Gottesman, 2002). Toutefois, ceci n'est pas observé dans le cas de CFT073. En effet, la mutation supplémentaire de *ryhB* ne permet pas un rétablissement, dans les deux types de milieux, mais bien une plus faible capacité de survie au H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ceci peut être expliqué par une récente découverte faite sur la première activation directe et transcriptionnelle génique par la protéine Fur. En effet, Nandal et son groupe de recherche ont démontré que le gène *ftnA*, codant pour la ferritine FtnA, est induit positivement par la protéine Fur-Fe<sup>2+</sup> et que cette activation est indépendante de RyhB (Nandal *et al.*, 2010). Ceci vient contredire ce qui a déjà été supposé sur la fonction régulatrice du petit ARNnc sur *ftnA* (Masse et Gottesman, 2002). Ainsi, chez un mutant *fur*, et chez le double mutant, en plus d'un transport continu de fer dans la bactérie, l'entreposage primaire par la ferritine est affecté, permettant ainsi une plus grande circulation et libération de fer libre dans la cellule. Ceci contribuerait à hausser la concentration intracellulaire de fer et, de ce fait, les risques de stress oxydatif. Le mutant *fur* et le double mutant présentent ainsi une capacité de survie beaucoup plus faible que la souche sauvage CFT073 en présence du réactif oxydatif car ce dernier réagit avec la quantité excessive de fer, produisant des espèces dommageables à la bactérie.

De plus, même si le mutant *ryhB* ne possède pas une capacité de survie moindre que la souche sauvage, l'absence de RyhB chez la souche double mutante ( $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*) semblerait jouer un rôle secondaire et important dans un milieu pauvre en fer car la souche est négativement plus affectée que la souche mutante  $\Delta$  *fur*. Ceci pourrait être expliqué par le fait que l'absence additionnelle du régulateur RyhB contribuerait à la sensibilité et à l'amplification de l'état critique de la souche. En effet, la souche qui est mutée au niveau du régulateur global Fur est déjà dans un état de stress, car divers gènes impliqués dans l'acquisition et le transport ferrique ainsi que dans la protection contre le stress oxydatif sont perturbés. En venant aussi muter *ryhB*, qui est généralement actif en conditions faibles en fer, d'autres systèmes de régulation du fer sont en plus dérégulés. Parmi ces derniers, il y a les protéines secondaires d'entreposage du fer (plus de 20% de l'entreposage), la défense contre le stress oxydatif via les protéines ferriques Dps et les protéines métaboliques possédant un centre Fe-S (McHugh *et al.*, 2003; Nandal *et al.*, 2010). Les résultats du test stipuleraient ainsi que le relâchement de la répression de ces systèmes par l'absence de RyhB, dont principalement l'entreposage secondaire du fer intracellulaire

excessivement accumulé chez le mutant *fur*, ne semblerait pas être suffisant pour réajuster l'homéostasie ferrique chez la souche double mutante. Il est important de noter, toutefois, que la dérégulation de ces systèmes chez le mutant individuel  $\Delta$  *ryhB* ne semble pas être assez importante pour affecter le taux de survie de la souche CFT073 de manière différente de la souche sauvage, et ce, dans les deux types de milieux. En effet, RyhB n'affecte pas l'entreposage ferrique primaire (ferritine FtnA), contrairement à Fur, et il est, jusqu'à ce jour, davantage associé à la protection contre l'anion superoxyde ( $O_2^-$ ) que le peroxyde d'hydrogène, via les SODs (Nandal *et al.*, 2010). Tel que mentionné précédemment, RyhB réprime le gène *sodB*, qui code pour la superoxide dismutase B, et qui est positivement régulé par Fur-Fe<sup>2+</sup>. Le gène *sodB* a pour fonction de réduire la concentration du radical libre, l' $O_2^-$ , afin de protéger la cellule contre le stress oxydatif. Ainsi, une perte de RyhB permettrait l'activation de *sodB* par Fur-Fe<sup>2+</sup>. De plus, SodB possède un centre Fe-S dont la production est fortement influencée par le petit ARNnc. Somme toute, l'absence de Fur diminuerait de manière significative la capacité de survie de la souche CFT073 en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> et l'absence additionnelle de RyhB contribuerait en plus à l'état de stress critique de la souche ( $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*), dans un milieu *in vitro* pauvre en fer, car des systèmes secondaires impliqués dans l'homéostasie de fer sont aussi dérégulés. En perspective, il serait intéressant d'étudier et de comparer le(s) rôle(s) des régulateurs RyhB et Fur dans le stress oxydatif impliquant des agents oxydatifs autre que le peroxyde d'hydrogène (ex. : le paraquet, la plumbagine, etc.).

Une étude récente, portée sur la relation entre la migration des neutrophiles humains et les bactéries uropathogènes, a démontré que les UPEC étaient en mesure de résister à l'action antimicrobienne des leucocytes et de freiner la production d'espèces réactives de l'oxygène qui apparaissent dans la première heure qui suit l'infection. En effet, le groupe de recherche a entamé une étude de la réponse transcriptionnelle des leucocytes en présence de souches *E. coli*. Celle-ci a révélé que la présence des UPEC réprimait l'expression de divers gènes des leucocytes qui sont directement responsables de la signalisation inflammatoire ainsi que de l'adhésion et de la migration, contrairement aux souches commensales non pathogènes. Des tests au sein d'un modèle *in vitro* ainsi que dans un modèle de cystite murin ont aussi démontré que les UPEC diminuaient le recrutement des neutrophiles au niveau des cellules épithéliales de la vessie, et ce au début de l'infection (réponse aiguë)

(Loughman et Hunstad, 2011). Tel que mentionné précédemment, la souche CFT073 double mutante était atténuée dans la vessie de souris au sein du modèle de co-infection et de mono-infection. De ce fait, une hypothèse qui expliquerait en partie l'atténuation de la souche dans la vessie pourrait être émise, basée sur l'étude de Loughman et Hunstad : les régulateurs RyhB et/ou Fur joueraient un rôle dans la protection et dans l'évasion de CFT073 au début du processus infectieux. Ainsi, leur absence combinée ne permettrait pas à la souche de résister à l'action antimicrobienne des leucocytes et aux espèces réactives de l'oxygène. La souche double mutante ne serait donc pas en mesure d'entrer en compétition avec une souche sauvage (Figure 3.1; page 79) et, à elle seule, de causer une cystite (Figure 3.2; page 80). La croissance retardée dans la première phase de croissance, observée dans le milieu pauvre en fer, vient aussi désavantager la souche mutante (Figure 3.4; page 83).

Fur et RyhB, ou leurs homologues, ont été démontrés comme important pour la régulation d'une diversité de gènes impliqués dans la virulence de plusieurs souches pathogènes, telles que *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium, *Vibrio cholerae* et *Shigella dysenteriae*. De plus, plusieurs études ont été effectuées chez les petits ARNnc démontrant qu'ils peuvent réguler plusieurs systèmes globaux et spécifiques, impliqués dans la viabilité et dans la survie bactérienne, tels que la famine, l'oxydation, le faible pH (l'acidité) et le stress membranaire et cellulaire (Mey *et al.*, 2005; Murphy et Payne, 2007; Benjamin *et al.*, 2010; Zhou et Xie, 2011). Jusqu'à ce jour, la fonction principale de RyhB repose au sein de l'homéostasie du fer. Toutefois, des études plus approfondies et transcriptionnelles, chez CFT073, pourront être effectuées afin de déterminer quels sont les gènes qui sont régulés (activation ou répression) par cet ARNnc et quels sont leurs implications au niveau des systèmes qui pourront affecter la virulence de la souche, tels que ceux du métabolisme cellulaire et de la résistance au système immunitaire inné de l'hôte.

#### **4.4 La production de sidérophores**

La souche uropathogène CFT073 est dotée de systèmes d'acquisition du fer, les sidérophores, qui lui permettent de séquestrer le fer des ferroprotéines de l'hôte (Lloyd *et al.*, 2007). Il est ainsi pertinent de tester les mutants CFT073 ( $\Delta fur$ ,  $\Delta ryhB$  et  $\Delta ryhB \Delta fur$ ) pour leur capacité à produire des sidérophores (l'entérobactine, les

salmochélines et l'aérobactine) dans un milieu minimal, le M63-glycérol, et d'ainsi démontrer l'implication de Fur et RyhB dans la production de ces molécules contribuant à la virulence des souches uropathogènes (Figure 3.7; page 88).

Diverses études antérieures et récentes ont démontré l'importance des mécanismes d'acquisition du fer dépendants du système TonB pour la survie des UPEC dans le tractus urinaire (Torres *et al.*, 2001; Hagan *et al.*, 2010). La transcription du gène *tonB*, requis pour le transport des sidérophores, est réprimée par Fur sous conditions aérobies et riches en fer. Toutefois, le tractus urinaire est un milieu pauvre en fer. De ce fait, Fur est peu ou pas actif dans ce milieu, permettant l'expression de *tonB* et, par conséquent, le transport de divers complexes ferriques. Les résultats démontrent ainsi que la souche mutante  $\Delta fur$  produit de manière similaire les trois types de sidérophores (Figure 3.7; page 88). Il existe aussi un modèle proposé dans une étude antérieure qui pourrait expliquer l'inactivation de *fur* dans un milieu minimal. Vecerek et son équipe ont démontré que l'ARNnc RyhB réprimerait post-transcriptionnellement le gène *fur* dans un milieu pauvre en fer (Vecerek *et al.*, 2007). Ainsi, RyhB contribuerait de façon indirecte à la production de sidérophores et, donc, à l'acquisition de fer extracellulaire. Toutefois, ce relâchement ne semble pas avantager le mutant  $\Delta fur$  *in vivo* lorsqu'il est mis en compétition avec la souche CFT073 sauvage, car il est atténué dans les reins de souris (Figure 3.1B; page 79). Cette atténuation serait davantage associée au fait que l'absence de Fur, qui est un régulateur global, compromettrait la régulation de plusieurs systèmes métaboliques, et de ceux aussi qui ne sont pas reliés à l'homéostasie du fer. La mutation additionnelle de *fur* chez le mutant  $\Delta ryhB$  ( $\Delta ryhB \Delta fur$ ) ne restaurait toujours pas la capacité de la souche à faire compétition dans les reins de souris. Ceci pourrait être expliqué en partie par le fait que la souche double mutante produit une quantité réduite des trois types de sidérophores dans le milieu pauvre en fer, tout comme la souche mutante *ryhB*. Les effets observés semblent donc être davantage causés par l'absence de RyhB que par celle de Fur. De plus, chez le mutant  $\Delta ryhB$ , l'expression de *fur* serait activée. Le fer qui réside probablement dans le milieu minimal, contribuerait à une faible activation de la protéine Fur et donc à une légère répression des gènes codant pour la biosynthèse de sidérophores (Vecerek *et al.*, 2007). Chez le mutant  $\Delta ryhB$ , la production des trois types de sidérophores est donc significativement plus faible que celle de la souche sauvage (Figure 3.7; page 88). De

plus, un groupe de recherche a récemment démontré l'importance de ce petit ARNnc pour la synthèse de l'entérobactine chez *E. coli* K-12 (Salvail *et al.*, 2010). La biosynthèse de ce sidérophore serait aussi promue par RyhB via l'activation traductionnelle directe de *shiA*, un gène codant pour une perméase de l'acide shikimique (Prevost *et al.*, 2007). Ce dernier est un composé aromatique participant dans la biosynthèse des sidérophores de type catécholate. RyhB pourrait donc être aussi impliqué dans la synthèse positive des sidérophores impliqués dans la pathogénèse de plusieurs bactéries, dont les salmochélines, qui sont des dérivés de l'entérobactine, ainsi que l'aérobactine, qui est dérivée d'une voie métabolique indépendante des sidérophores catécholates et implique le citrate et l'acide aminé lysine pour sa synthèse.

Ainsi, la production des trois types majeurs de sidérophores produits par *E. coli* est négativement affectée, amenant la souche CFT073 double mutante ( $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*) à une capacité réduite à entrer en compétition avec la souche sauvage dans la vessie et dans les reins de souris (co-infections) ainsi qu'à causer une infection seule au niveau de la vessie (mono-infections) (Figures 3.1 et 3.2; pages 79 et 80). Ces résultats concordent avec ceux qui ont déjà été présentés dans le cadre d'une étude portée sur l'importance du système TonB chez les UPEC. En effet, un groupe de recherche avait démontré qu'une souche CFT073 mutée au niveau de la synthèse de l'aérobactine et de l'entérobactine était atténuée dans un modèle murin de mono-infection. Toutefois, une souche mutée au niveau d'un seul des systèmes d'acquisition ou de transport du fer, soit celui de l'aérobactine ou de l'hème (qui sont dépendants de TonB), était toujours en mesure de coloniser la vessie et les reins de souris lorsque mise en compétition avec une souche sauvage, car les systèmes se compensent entre eux afin d'acquérir le fer nécessaire (Torres *et al.*, 2001). Aussi, la synthèse de sidérophores catécholates chez la souche aviaire *E. coli*  $\chi$ 7122, un ExPEC causant la colibacillose chez la volaille, n'est pas nécessaire pour causer une infection systémique lorsque le système de l'aérobactine est fonctionnel (Caza *et al.*, 2011). Dans notre cas, c'est la régulation de la majorité des systèmes de l'homéostasie du fer qui est affectée, ce qui désavantagerait le double mutant en co-infection (Figure 3.1; page 79). Toutefois, la souche double mutante, malgré sa faible capacité à produire des sidérophores, était toujours en mesure d'infecter les reins de souris en mono-infection au même titre que la souche sauvage (Figure 3.2B; page 80). Il y aurait ainsi

un autre système d'acquisition du fer qui pourrait permettre à la souche de coloniser les reins de souris et qui serait suffisant en absence des régulateurs RyhB et Fur.

De récentes études ont démontré que l'acquisition et le transport de l'hème sont plus importants que ceux du fer ferrique pour la colonisation des reins par les souches UPEC. En effet, les récepteurs de l'hème ChuA et Hma ont été identifiés chez la souche CFT073 comme étant responsables de l'acquisition ferrique contenue dans l'hème et, de ce fait, de la virulence de la souche dans un modèle murin (Ridley *et al.*, 2006; Hagan et Mobley, 2009). Pourtant, Torres et son groupe de recherche ont émis que l'acquisition ferrique via le transport de l'hème ne semblerait pas être suffisante pour permettre à la souche de causer une infection au niveau des reins de souris, car la souche mutée seulement au niveau des systèmes des sidérophores était toujours atténuée dans un modèle de mono-infection murin (Torres *et al.*, 2001). Toutefois, chez ce mutant, la régulation génique via Fur et RyhB est toujours présente, contrairement à dans notre cas. Une boîte putative *fur* a été retrouvée au sein du promoteur du gène *hma* suggérant que ce récepteur est régulé de manière dépendante par Fur, chez la souche CFT073 (Hagan et Mobley, 2009). Cependant, aucune boîte *fur* n'a été jusqu'à ce jour identifiée pour le promoteur de *chuA* chez la souche uropathogène, mais une étude chez la souche *E. coli* entérohémorragique O157 : H7 (EDL933) a permis d'affirmer que ce gène est régulé par Fur (Torres et Payne, 1997). Il est donc probable que l'expression des gènes *chuA* et *hma* soit contrôlée par le régulateur Fur chez CFT073 et, de ce fait, son absence dans la souche double mutante provoquerait une expression continue et positive des récepteurs de l'hème. Ceci ne serait donc pas observé chez une souche mutée uniquement au niveau de la synthèse et de la production de sidérophores. Cette régulation positive permettrait ainsi à la souche déficiente en production de sidérophores d'acquies tout de même le fer qui est nécessaire à sa survie et à sa croissance dans les reins. La souche CFT073 double mutante ( $\Delta$  *ryhB*  $\Delta$  *fur*) de notre étude ne présente donc pas d'atténuation dans les reins de souris en comparaison de la souche sauvage dans le modèle de mono-infection murin (Figure 3.2B; page 80). De plus, il se pourrait que RyhB joue un rôle complémentaire au niveau de cette régulation positive en raison du fait que son absence chez la souche double mutante, ne semble pas interférer dans la virulence de manière négative. Il a été démontré chez d'autres souches pathogènes que RyhB joue un rôle dans la pathogénèse en interférant au niveau de l'homéostasie du fer. Par

exemple, le gène *hlyA*, codant pour une hémolysine nécessaire au mécanisme d'acquisition de l'hème (et d'autres impliqués dans le transport du fer ferrique) chez *V. cholerae* serait réprimé en absence de RyhB (Rogers *et al.*, 2000; Mey *et al.*, 2005).

Afin de mieux explorer les rôles individuels que possède chacun des régulateurs, il serait ainsi intéressant d'étudier les mutants simples dans un modèle de mono-infection et de procéder à des études de régulation génique. Le mécanisme de régulation de la biosynthèse de sidérophores par RyhB, dans un milieu minimal, et de concert avec Fur, nécessite aussi davantage d'études approfondies pour être élucidé.

## Conclusion

Diverses études antérieures ont démontré l'importance des régulateurs de l'homéostasie du fer pour la survie des entérobactéries. Chez *E. coli* K-12, les mécanismes d'acquisition et d'entreposage du fer sont principalement contrôlés par la protéine Fur, de concert avec le petit ARN non codant, RyhB. Chaque régulateur possède ses propres caractéristiques ainsi que son mode de fonctionnement, mais leurs rôles combinés procurent à la souche une régulation adéquate des systèmes d'acquisition de fer et des systèmes de protection contre un stress oxydatif lié au fer. Malgré le fait que plusieurs études aient démontré l'importance individuelle de Fur et RyhB pour certains pathogènes entériques, leur rôles dans la virulence des souches *E. coli* causant des infections extra-intestinales (ExPEC) n'ont jusqu'alors jamais été élucidés. Les objectifs de ce projet consistaient donc à caractériser les rôles de ces régulateurs au niveau de systèmes métaboliques qui sont importants pour la virulence. Ces derniers consistent en la production de sidérophores, un système de chélation de fer extracellulaire hautement efficace, ainsi qu'en la capacité de survivre en présence d'un stress oxydatif. Cette étude a ainsi été faite chez une souche qui cause des infections du tractus urinaire : la souche virulente CFT073.

Cette étude a démontré plusieurs résultats intéressants quant à l'implication de Fur et RyhB pour la virulence d'une souche d'*E. coli* uropathogène (UPEC). Tout d'abord, des tests *in vivo* effectués chez le modèle du tractus urinaire murin ont démontré que la perte combinée des régulateurs de fer atténue principalement la souche dans sa capacité à infecter la vessie de souris. De plus, la souche mutée au niveau de *fur* et *ryhB*, mise en compétition avec la souche virulente sauvage, ne peut coloniser la vessie et les reins de souris. Afin de mieux comprendre les résultats obtenus, divers tests phénotypiques reliés à la virulence ont été effectués. Ceux-ci ont servi à étudier les effets d'une perte individuelle ou combinée de Fur et de RyhB sur plusieurs systèmes de régulation de fer qui pourraient être importants pour la virulence de la souche UPEC. Ainsi, les résultats démontrent que l'absence du régulateur Fur cause un retard de croissance dans un milieu où le fer est limité. De plus, la perte combinée de RyhB et Fur, désavantage la souche sur plusieurs niveaux. Tout d'abord, la souche double mutante possède une capacité plus faible à produire les trois types de

sidérophores, soient l'entérobactine, les salmochélines et l'aérobactine. La perturbation de la synthèse de sidérophores ne permettrait pas à la souche d'acquérir le fer qui lui est nécessaire pour sa survie. De ce fait, la souche mutante serait moins apte à survivre dans une niche où le fer est limité et où ce système de chélation est important, telle que la vessie. Par contre, dans les reins, le besoin en sidérophores pourrait être moins critique pour CFT073, et les systèmes d'acquisition du fer via l'hème seraient probablement davantage utilisés dans ces organes. En second lieu, la perte simultanée des régulateurs Fur ou RyhB diminue significativement la capacité de la souche à survivre en présence d'un stress oxydatif associé au peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Ces données suggèrent donc que les régulateurs sont importants pour protéger la bactérie contre le stress oxydatif engendré par le système immunitaire de l'hôte, et ce, au début et au cours de l'infection.

En conclusion, les résultats présentés dans ce mémoire suggèrent que les régulateurs de l'homéostasie du fer, Fur et RyhB, possèdent un rôle important dans la virulence de la souche uropathogène CFT073, en particulier dans la vessie. En effet, les différentes données obtenues grâce aux tests phénotypiques viennent en partie appuyer les résultats de virulence obtenus dans le modèle murin. De plus, ce mémoire présente la première étude qui démontre les effets du petit ARN non codant, RyhB, chez une souche ExPEC. Toutefois, afin de mieux comprendre et de caractériser l'implication de Fur et de RyhB pour la virulence de ces souches, il serait intéressant de poursuivre des études plus approfondies, et ce, en visant davantage les mécanismes de régulation des régulateurs sur les divers systèmes impliqués dans l'homéostasie du fer.

## Références

- Abdul-Tehrani, H., A. J. Hudson, Y. S. Chang, A. R. Timms, C. Hawkins, J. M. Williams, P. M. Harrison, J. R. Guest et S. C. Andrews.** 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient. *Journal of Bacteriology* 181 (5):1415-28.
- Adhikari, P., S. A. Berish, A. J. Nowalk, K. L. Veraldi, S. A. Morse et T. A. Mietzner.** 1996. The fbpABC locus of *Neisseria gonorrhoeae* functions in the periplasm-to-cytosol transport of iron. *Journal of Bacteriology* 178 (7):2145-9.
- Almiron, M., A. J. Link, D. Furlong et R. Kolter.** 1992. A novel DNA-binding protein with regulatory and protective roles in starved *Escherichia coli*. *Genes and Development* 6 (12B):2646-54.
- Alteri, C. J., E. C. Hagan, K. E. Sivick, S. N. Smith et H. L. Mobley.** 2009. Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathogens* 5 (9):e1000586.
- Altuvia, S., D. Weinstein-Fischer, A. Zhang, L. Postow et G. Storz.** 1997. A small, stable RNA induced by oxidative stress: role as a pleiotropic regulator and antimutator. *Cell* 90 (1):43-53.
- Amabile-Cuevas, C. F. et B. Dimple.** 1991. Molecular characterization of the soxRS genes of *Escherichia coli*: two genes control a superoxide stress regulon. *Nucleic Acids Research* 19 (16):4479-84.
- Andrews, S. C.** 1998. Iron storage in bacteria. *Advances in Microbial Physiology* 40:281-351.
- Andrews, S. C., A. K. Robinson et F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Review* 27 (2-3):215-37.
- Argaman, L., R. Hershberg, J. Vogel, G. Bejerano, E. G. Wagner, H. Margalit et S. Altuvia.** 2001. Novel small RNA-encoding genes in the intergenic regions of *Escherichia coli*. *Current Biology* 11 (12):941-50.
- Asad, L. M., N. R. Asad, A. B. Silva, C. E. de Almeida et A. C. Leitao.** 1997. Role of SOS and OxyR systems in the repair of *Escherichia coli* submitted to hydrogen peroxide under low iron conditions. *Biochimie* 79 (6):359-64.

- Asad, N. R., L. M. Asad, C.E. de Almeida, I. Felzenszwalb, J.B. Cabral-Neto et A. C. Leitao.** 2004. Several pathways of hydrogen peroxide action that damage the *E. coli* genome. *Genetics and Molecular Biology* 27 (2):291-303.
- Asad, N. R. et A. C. Leitao.** 1991. Effects of metal ion chelators on DNA strand breaks and inactivation produced by hydrogen peroxide in *Escherichia coli*: detection of iron-independent lesions. *Journal of Bacteriology* 173 (8):2562-8.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner et H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2:2006 0008.
- Bach, S., A. de Almeida et E. Carniel.** 2000. The *Yersinia* high-pathogenicity island is present in different members of the family Enterobacteriaceae. *FEMS Microbiology Letters* 183 (2):289-94.
- Bagg, A. et J. B. Neilands.** 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26 (17):5471-7.
- Baumler, A. J., T. L. Norris, T. Lasco, W. Voight, R. Reissbrodt, W. Rabsch et F. Heffron.** 1998. IroN, a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enterica*. *Journal of Bacteriology* 180 (6):1446-53.
- Bearden, S. W. et R. D. Perry.** 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Molecular Microbiology* 32 (2):403-14.
- Belanger, L., A. Garenaux, J. Harel, M. Boulianne, E. Nadeau et C. M. Dozois.** 2011. *Escherichia coli* from animal reservoirs as a potential source of human extraintestinal pathogenic *E. coli*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*.
- Benjamin, J. A., G. Desnoyers, A. Morissette, H. Salvail et E. Masse.** 2010. Dealing with oxidative stress and iron starvation in microorganisms: an overview. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 88 (3):264-72.
- Benjamin, W. H., Jr., C. L. Turnbough, Jr., B. S. Posey et D. E. Briles.** 1985. The ability of *Salmonella typhimurium* to produce the siderophore enterobactin is not a virulence factor in mouse typhoid. *Infection and Immunity* 50 (2):392-7.

- Bister, B., D. Bischoff, G. J. Nicholson, M. Valdebenito, K. Schneider, G. Winkelmann, K. Hantke et R. D. Sussmuth.** 2004. The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of *Salmonella enterica*. *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 17 (4):471-81.
- Bleuel, C., C. Grosse, N. Taudte, J. Scherer, D. Wesenberg, G. J. Krauss, D. H. Nies et G. Grass.** 2005. TolC is involved in enterobactin efflux across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187 (19):6701-7.
- Bonacorsi, S. P., O. Clermont, C. Tinsley, I. Le Gall, J. C. Beaudoin, J. Elion, X. Nassif et E. Bingen.** 2000. Identification of regions of the *Escherichia coli* chromosome specific for neonatal meningitis-associated strains. *Infection and Immunity* 68 (4):2096-101.
- Braun, V. et M. Braun.** 2002. Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. *FEBS Letters* 529 (1):78-85.
- Brickman, T. J., B. A. Ozenberger et M. A. McIntosh.** 1990. Regulation of divergent transcription from the iron-responsive *fepB-entC* promoter-operator regions in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 212 (4):669-82.
- Brock, J. H., M. G. Pickering, M. C. McDowall et A. G. Deacon.** 1983. Role of antibody and enterobactin in controlling growth of *Escherichia coli* in human milk and acquisition of lactoferrin- and transferrin-bound iron by *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 40 (2):453-9.
- Brzuszkiewicz, E., H. Bruggemann, H. Liesegang, M. Emmerth, T. Olschlager, G. Nagy, K. Albermann, C. Wagner, C. Buchrieser, L. Emody, G. Gottschalk, J. Hacker et U. Dobrindt.** 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103 (34):12879-84.
- Calderwood, S. B. et J. J. Mekalanos.** 1987. Iron regulation of Shiga-like toxin expression in *Escherichia coli* is mediated by the *fur* locus. *Journal of Bacteriology* 169 (10):4759-64.
- Carbonetti, N. H., S. Boonchai, S. H. Parry, V. Vaisanen-Rhen, T. K. Korhonen et P. H. Williams.** 1986. Aerobactin-mediated iron uptake by *Escherichia coli* isolates from human extraintestinal infections. *Infection and Immunity* 51 (3):966-8.

- Carniel, E.** 1999. The *Yersinia* high-pathogenicity island. *International Microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology* 2 (3):161-7.
- Carpenter, B. M., J. M. Whitmire et D. S. Merrell.** 2009. This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis. *Infection and Immunity* 77 (7):2590-601.
- Caza, M., F. Lepine et C. M. Dozois.** 2011. Secretion, but not overall synthesis, of catecholate siderophores contributes to virulence of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 80 (1):266-82.
- Caza, M., F. Lepine, S. Milot et C. M. Dozois.** 2008. Specific roles of the iroBCDEN genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infection and Immunity* 76 (8):3539-49.
- Christman, M. F., R. W. Morgan, F. S. Jacobson et B. N. Ames.** 1985. Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell* 41 (3):753-62.
- Clermont, O., S. Bonacorsi et E. Bingen.** 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island is highly predominant in virulence-associated phylogenetic groups of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 196 (2):153-7.
- Cornelissen, C. N. et P. F. Sparling.** 1994. Iron piracy: acquisition of transferrin-bound iron by bacterial pathogens. *Molecular Microbiology* 14 (5):843-50.
- Courcelle, J., A. Khodursky, B. Peter, P. O. Brown et P. C. Hanawalt.** 2001. Comparative gene expression profiles following UV exposure in wild-type and SOS-deficient *Escherichia coli*. *Genetics* 158 (1):41-64.
- Coy, M. et J. B. Neilands.** 1991. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* 30 (33):8201-10.
- Crichton, R. R., S. Wilmet, R. Leggsyter et R. J. Ward.** 2002. Molecular and cellular mechanisms of iron homeostasis and toxicity in mammalian cells. *Journal of Inorganic Biochemistry* 91 (1):9-18.
- Crosa, J. H. et C. T. Walsh.** 2002. Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66 (2):223-49.

- Crouch, M. L., M. Castor, J. E. Karlinsey, T. Kalthorn et F. C. Fang.** 2008. Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Molecular Microbiology* 67 (5):971-83.
- D'Autreaux, B., L. Pecqueur, A. Gonzalez de Peredo, R. E. Diederix, C. Caux-Thang, L. Tabet, B. Bersch, E. Forest et I. Michaud-Soret.** 2007. Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* 46 (5):1329-42.
- Datsenko, K. A. et B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (12):6640-5.
- Davis, B. M., M. Quinones, J. Pratt, Y. Ding et M. K. Waldor.** 2005. Characterization of the small untranslated RNA RyhB and its regulon in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 187 (12):4005-14.
- De Groote, M. A., U. A. Ochsner, M. U. Shiloh, C. Nathan, J. M. McCord, M. C. Dinauer, S. J. Libby, A. Vazquez-Torres, Y. Xu et F. C. Fang.** 1997. Periplasmic superoxide dismutase protects *Salmonella* from products of phagocyte NADPH-oxidase and nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (25):13997-4001.
- de Lorenzo, V. et J. B. Neilands.** 1986. Characterization of iucA and iucC genes of the aerobactin system of plasmid ColV-K30 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 167 (1):350-5.
- de Lorenzo, V., J. Perez-Martin, L. Escolar, Graziano Pesole et Giovanni Bertoni.** 2004. Mode of binding of the Fur protein to target DNA : negative regulation of iron-controlled gene expression. In *Iron transport in bacteria* Washington, D.C.: ASM Press.
- de Lorenzo, V., S. Wee, M. Herrero et J. B. Neilands.** 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *Journal of Bacteriology* 169 (6):2624-30.
- Delicato, E. R., B. G. de Brito, L. C. Gaziri et M. C. Vidotto.** 2003. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. *Veterinary Microbiology* 94 (2):97-103.
- Demple, B., J. Halbrook et S. Linn.** 1983. *Escherichia coli* xth mutants are hypersensitive to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology* 153 (2):1079-82.

- Desnoyers, G., A. Morissette, K. Prevost et E. Masse.** 2009. Small RNA-induced differential degradation of the polycistronic mRNA iscRSUA. *The EMBO Journal* 28 (11):1551-61.
- Dho-Moulin, M. et J. M. Fairbrother.** 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* 30 (2-3):299-316.
- Dozois, C. M. et R. Curtiss, 3rd.** 1999. Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Veterinary Research* 30 (2-3):157-79.
- Dozois, C. M., F. Daigle et R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (1):247-52.
- Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Bree, J. M. Fairbrother, C. Desautels et R. Curtiss, 3rd.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infection and Immunity* 68 (7):4145-54.
- Dozois, C. M., J. M. Fairbrother, J. Harel et M. Bosse.** 1992. pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infection and Immunity* 60 (7):2648-56.
- Dubrac, S. et D. Touati.** 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the sodB promoter. *Journal of Bacteriology* 182 (13):3802-8.
- Duriez, P., O. Clermont, S. Bonacorsi, E. Bingen, A. Chaventre, J. Elion, B. Picard et E. Denamur.** 2001. Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* 147 (Pt 6):1671-6.
- Ellermeier, J. R. et J. M. Schlauch.** 2008. Fur regulates expression of the *Salmonella* pathogenicity island 1 type III secretion system through HilD. *Journal of Bacteriology* 190 (2):476-86.
- Faraldo-Gomez, J. D. et M. S. Sansom.** 2003. Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 4 (2):105-16.

- Fischbach, M. A., H. Lin, D. R. Liu et C. T. Walsh.** 2005. *In vitro* characterization of IroB, a pathogen-associated C-glycosyltransferase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (3):571-6.
- Fischbach, M. A., H. Lin, D. R. Liu et C. T. Walsh.** 2006a. How pathogenic bacteria evade mammalian sabotage in the battle for iron. *Nature Chemical Biology* 2 (3):132-8.
- Fischbach, M. A., H. Lin, L. Zhou, Y. Yu, R. J. Abergel, D. R. Liu, K. N. Raymond, B. L. Wanner, R. K. Strong, C. T. Walsh, A. Aderem et K. D. Smith.** 2006b. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (44):16502-7.
- Flo, T. H., K. D. Smith, S. Sato, D. J. Rodriguez, M. A. Holmes, R. K. Strong, S. Akira et A. Aderem.** 2004. Lipocalin 2 mediates an innate immune response to bacterial infection by sequestering iron. *Nature* 432 (7019):917-21.
- Foster, J. W.** 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of Bacteriology* 173 (21):6896-902.
- Foxman, B.** 2002. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American Journal of Medicine* 113 Suppl 1A:5S-13S.
- Foxman, B., B. Gillespie, J. Koopman, L. Zhang, K. Palin, P. Tallman, J. V. Marsh, S. Spear, J. D. Sobel, M. J. Marty et C. F. Marrs.** 2000. Risk factors for second urinary tract infection among college women. *The American Journal of Epidemiology* 151 (12):1194-205.
- Friedberg, Errol C., Graham C. Walker et Wolfram Siede.** 2006. *DNA repair and mutagenesis*. 2nd ed. / Errol C. Friedberg ... [et al.]. ed. Washington, D.C.: ASM Press.
- Furrer, J. L., D. N. Sanders, I. G. Hook-Barnard et M. A. McIntosh.** 2002. Export of the siderophore enterobactin in *Escherichia coli*: involvement of a 43 kDa membrane exporter. *Molecular Microbiology* 44 (5):1225-34.
- Gaballa, A., H. Antelmann, C. Aguilar, S. K. Khakh, K. B. Song, G. T. Smaldone et J. D. Helmann.** 2008. The *Bacillus subtilis* iron-sparing response is mediated by a Fur-regulated small RNA and three small, basic proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (33):11927-32.

- Garg, R. P., C. J. Vargo, X. Cui et D. M. Kurtz, Jr.** 1996. A [2Fe-2S] protein encoded by an open reading frame upstream of the *Escherichia coli* bacterioferritin gene. *Biochemistry* 35 (20):6297-301.
- Gaudu, P., N. Moon et B. Weiss.** 1997. Regulation of the soxRS oxidative stress regulon. Reversible oxidation of the Fe-S centers of SoxR *in vivo*. *The Journal of Biological Chemistry* 272 (8):5082-6.
- Genco, C. A. et D. W. Dixon.** 2001. Emerging strategies in microbial haem capture. *Molecular Microbiology* 39 (1):1-11.
- George, D. B. et A. R. Manges.** 2010. A systematic review of outbreak and non-outbreak studies of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing community-acquired infections. *Epidemiology and Infection* 138 (12):1679-90.
- Giel, J. L., D. Rodionov, M. Liu, F. R. Blattner et P. J. Kiley.** 2006. IscR-dependent gene expression links iron-sulphur cluster assembly to the control of O<sub>2</sub>-regulated genes in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 60 (4):1058-75.
- Goetz, D. H., M. A. Holmes, N. Borregaard, M. E. Bluhm, K. N. Raymond et R. K. Strong.** 2002. The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Molecular Cell* 10 (5):1033-43.
- Gorden, J. et P. L. Small.** 1993. Acid resistance in enteric bacteria. *Infection and Immunity* 61 (1):364-7.
- Gottesman, S.** 2004. The small RNA regulators of *Escherichia coli*: roles and mechanisms\*. *Annual Review of Microbiology* 58:303-28.
- Grifantini, R., S. Sebastian, E. Frigimelica, M. Draghi, E. Bartolini, A. Muzzi, R. Rappuoli, G. Grandi et C. A. Genco.** 2003. Identification of iron-activated and -repressed Fur-dependent genes by transcriptome analysis of *Neisseria meningitidis* group B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (16):9542-7.
- Griffiths, E.** 1997. Iron and the virulence of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli : Mechanisms of Virulence*: Cambridge University Press.
- Griffiths, E.** 1999. Iron in biological systems. In *Iron and Infection*. Chichester ; New York: John Wiley.

- Groisman, E. A. et H. Ochman.** 1996. Pathogenicity islands: bacterial evolution in quantum leaps. *Cell* 87 (5):791-4.
- Haagmans, W. et M. van der Woude.** 2000. Phase variation of Ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Molecular Microbiology* 35 (4):877-87.
- Hacker, J. et J. B. Kaper.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology* 54:641-79.
- Hagan, E. C., A. L. Lloyd, D. A. Rasko, G. J. Faerber et H. L. Mobley.** 2010. *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathogens* 6 (11):e1001187.
- Hagan, E. C. et H. L. Mobley.** 2009. Haem acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. *Molecular Microbiology* 71 (1):79-91.
- Hagberg, L., I. Engberg, R. Freter, J. Lam, S. Olling et C. Svanborg Eden.** 1983. Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infection and Immunity* 40 (1):273-83.
- Hall, H. K. et J. W. Foster.** 1996. The role of fur in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *Journal of Bacteriology* 178 (19):5683-91.
- Hanahan, D., J. Jessee et F. R. Bloom.** 1991. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods in Enzymology* 204:63-113.
- Hancock, V., L. Ferrieres et P. Klemm.** 2008. The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious *Escherichia coli* in human urine. *Microbiology* 154 (Pt 1):167-75.
- Hantke, K.** 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 4 (2):172-7.
- Harrison, P. M. et P. Arosio.** 1996. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochimica and Biophysica Acta* 1275 (3):161-203.

- He, Z., K. D. Stigers Lavoie, P. A. Bartlett et M. D. Toney.** 2004. Conservation of mechanism in three chorismate-utilizing enzymes. *Journal of the American Chemical Society* 126 (8):2378-85.
- Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye et T. S. Whittam.** 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 172 (11):6175-81.
- Hidalgo, E., J. M. Bollinger, Jr., T. M. Bradley, C. T. Walsh et B. Demple.** 1995. Binuclear [2Fe-2S] clusters in the *Escherichia coli* SoxR protein and role of the metal centers in transcription. *The Journal of Biological Chemistry* 270 (36):20908-14.
- Higgs, P. I., R. A. Larsen et K. Postle.** 2002. Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Molecular Microbiology* 44 (1):271-81.
- Hoerter, J. D., A. A. Arnold, C. S. Ward, M. Sauer, S. Johnson, T. Fleming et A. Eisenstark.** 2005. Reduced hydroperoxidase (HPI and HPII) activity in the Deltafur mutant contributes to increased sensitivity to UVA radiation in *Escherichia coli*. *Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology* 79 (2):151-7.
- Hooton, T. M.** 2003. Fluoroquinolones and resistance in the treatment of uncomplicated urinary tract infection. *International journal of antimicrobial agents* 22 Suppl 2:65-72.
- Hooton, T. M., C. Winter, F. Tiu et W. E. Stamm.** 1996. Association of acute cystitis with the stage of the menstrual cycle in young women. *Clinical Infectious Diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 23 (3):635-6.
- Horsburgh, M. J., E. Ingham et S. J. Foster.** 2001. In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *Journal of Bacteriology* 183 (2):468-75.
- Hunt, M. D., G. S. Pettis et M. A. McIntosh.** 1994. Promoter and operator determinants for fur-mediated iron regulation in the bidirectional fepA-fes control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. *Journal of Bacteriology* 176 (13):3944-55.
- Imlay, J. A.** 2008. Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide. *Annual Review of Biochemistry* 77:755-76.

- Imlay, J. A. et S. Linn.** 1987. Mutagenesis and stress responses induced in *Escherichia coli* by hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology* 169 (7):2967-76.
- Imlay, K. R. et J. A. Imlay.** 1996. Cloning and analysis of *sodC*, encoding the copper-zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 178 (9):2564-71.
- Jacques, J. F., S. Jang, K. Prevost, G. Desnoyers, M. Desmarais, J. Imlay et E. Masse.** 2006. RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 62 (4):1181-90.
- Janakiraman, A. et J. M. Slauch.** 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPII is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 35 (5):1146-55.
- Jaureguy, F.** 2009. [Host and bacterial determinants of *Escherichia coli* extra intestinal infections]. *Medicine Sciences : M/S* 25 (3):221-3.
- Johnson, J. R., C. Clabots et H. Rosen.** 2006. Effect of inactivation of the global oxidative stress regulator *oxyR* on the colonization ability of *Escherichia coli* O1:K1:H7 in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infection and Immunity* 74 (1):461-8.
- Johnson, J. R., M. A. Kuskowski, T. T. O'Bryan et J. N. Maslow.** 2002a. Epidemiological correlates of virulence genotype and phylogenetic background among *Escherichia coli* blood isolates from adults with diverse-source bacteremia. *The Journal of Infectious Diseases* 185 (10):1439-47.
- Johnson, J. R., A. R. Manges, T. T. O'Bryan et L. W. Riley.** 2002b. A disseminated multidrug-resistant clonal group of uropathogenic *Escherichia coli* in pyelonephritis. *Lancet* 359 (9325):2249-51.
- Johnson, J. R. et T. A. Russo.** 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *Journal of Laboratory and Clinical Medicine* 139 (3):155-62.
- Johnson, J. R. et T. A. Russo.** 2005. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. *International Journal of Medical Microbiology* 295 (6-7):383-404.

- Johnson, J. R., T. A. Russo, P. I. Tarr, U. Carlino, S. S. Bilge, J. C. Vary, Jr. et A. L. Stell.** 2000. Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *ironN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity* 68 (5):3040-7.
- Kammler, M., C. Schon et K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 175 (19):6212-9.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro et H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2 (2):123-40.
- Karjalainen, T. K., D. G. Evans, D. J. Evans, Jr., D. Y. Graham et C. H. Lee.** 1991. Iron represses the expression of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *E. coli*. *Microbial Pathogenesis* 11 (5):317-23.
- Kiley, P. J. et H. Beinert.** 2003. The role of Fe-S proteins in sensing and regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* 6 (2):181-5.
- Kitagawa, M., T. Ara, M. Arifuzzaman, T. Ioka-Nakamichi, E. Inamoto, H. Toyonaga et H. Mori.** 2005. Complete set of ORF clones of *Escherichia coli* ASKA library (a complete set of *E. coli* K-12 ORF archive): unique resources for biological research. *DNA Research* 12 (5):291-9.
- Kjeldsen, L., J. B. Cowland et N. Borregaard.** 2000. Human neutrophil gelatinase-associated lipocalin and homologous proteins in rat and mouse. *Biochimica and Biophysica Acta* 1482 (1-2):272-83.
- Koster, W. et V. Braun.** 1990. Iron (III) hydroxamate transport into *Escherichia coli*. Substrate binding to the periplasmic FhuD protein. *The Journal of Biological Chemistry* 265 (35):21407-10.
- Lavrrar, J. L. et M. A. McIntosh.** 2003. Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *Journal of Bacteriology* 185 (7):2194-202.
- Lee, K. C., W. S. Yeo et J. H. Roe.** 2008. Oxidant-responsive induction of the *suf* operon, encoding a Fe-S assembly system, through Fur and IscR in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 190 (24):8244-7.
- Letain, T. E. et K. Postle.** 1997. TonB protein appears to transduce energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 24 (2):271-83.

- Letoffe, S., V. Redeker et C. Wandersman.** 1998. Isolation and characterization of an extracellular haem-binding protein from *Pseudomonas aeruginosa* that shares function and sequence similarities with the *Serratia marcescens* HasA haemophore. *Molecular Microbiology* 28 (6):1223-34.
- Li, B., P. Smith, D. J. Horvath, Jr., F. E. Romesberg et S. S. Justice.** 2010. SOS regulatory elements are essential for UPEC pathogenesis. *Microbes and Infection* 12 (8-9):662-8.
- Lin, H., M. A. Fischbach, D. R. Liu et C. T. Walsh.** 2005. *In vitro* characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc* 127 (31):11075-84.
- Liu, J., N. Quinn, G. A. Berchtold et C. T. Walsh.** 1990. Overexpression, purification, and characterization of isochorismate synthase (EntC), the first enzyme involved in the biosynthesis of enterobactin from chorismate. *Biochemistry* 29 (6):1417-25.
- Lloyd, A. L., D. A. Rasko et H. L. Mobley.** 2007. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 189 (9):3532-46.
- Loughman, J. A. et D. A. Hunstad.** 2011. Attenuation of human neutrophil migration and function by uropathogenic bacteria. *Microbes and Infection* 13 (6):555-65.
- Marrs, C. F., L. Zhang et B. Foxman.** 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters* 252 (2):183-90.
- Masi, M., P. Vuong, M. Humbard, K. Malone et R. Misra.** 2007. Initial steps of colicin E1 import across the outer membrane of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 189 (7):2667-76.
- Masse, E. et M. Arguin.** 2005. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. *Trends in Biochemical Sciences* 30 (8):462-8.
- Masse, E., F. E. Escorcía et S. Gottesman.** 2003. Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*. *Genes and Development* 17 (19):2374-83.

- Masse, E. et S. Gottesman.** 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (7):4620-5.
- Masse, E., H. Salvail, G. Desnoyers et M. Arguin.** 2007. Small RNAs controlling iron metabolism. *Current Opinion in Microbiology* 10 (2):140-5.
- Masse, E., C. K. Vanderpool et S. Gottesman.** 2005. Effect of RyhB small RNA on global iron use in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 187 (20):6962-71.
- McHugh, J. P., F. Rodriguez-Quinones, H. Abdul-Tehrani, D. A. Svistunenko, R. K. Poole, C. E. Cooper et S. C. Andrews.** 2003. Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (32):29478-86.
- Mellin, J. R., S. Goswami, S. Grogan, B. Tjaden et C. A. Genco.** 2007. A novel fur- and iron-regulated small RNA, NrrF, is required for indirect fur-mediated regulation of the *sdhA* and *sdhC* genes in *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology* 189 (10):3686-94.
- Mey, A. R., S. A. Craig et S. M. Payne.** 2005. Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation. *Infection and Immunity* 73 (9):5706-19.
- Miethke, M. et M. A. Marahiel.** 2007. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 71 (3):413-51.
- Miller, R. A. et B. E. Britigan.** 1997. Role of oxidants in microbial pathophysiology. *Clinical Microbiology Reviews* 10 (1):1-18.
- Miquel, S., E. Peyretailade, L. Claret, A. de Vallee, C. Dossat, B. Vacherie, H. Zineb el, B. Segurens, V. Barbe, P. Sauvanet, C. Neut, J. F. Colombel, C. Medigue, F. J. Mojica, P. Peyret, R. Bonnet et A. Darfeuille-Michaud.** 2010. Complete genome sequence of Crohn's disease-associated adherent-invasive *E. coli* strain LF82. *PLoS ONE* 5 (9).
- Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockett, B. D. Jones et J. W. Warren.** 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infection and Immunity* 58 (5):1281-9.

- Montgomerie, J. Z., A. Bindereif, J. B. Neilands, G. M. Kalmanson et L. B. Guze.** 1984. Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infection and Immunity* 46 (3):835-8.
- Morgan, R. W., M. F. Christman, F. S. Jacobson, G. Storz et B. N. Ames.** 1986. Hydrogen peroxide-inducible proteins in *Salmonella typhimurium* overlap with heat shock and other stress proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (21):8059-63.
- Mulvey, M. A.** 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 4 (5):257-71.
- Mulvey, M. A., J. D. Schilling, J. J. Martinez et S. J. Hultgren.** 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (16):8829-35.
- Murphy, E. R. et S. M. Payne.** 2007. RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates *Shigella dysenteriae* virulence. *Infection and Immunity* 75 (7):3470-7.
- Nandal, A., C. C. Huggins, M. R. Woodhall, J. McHugh, F. Rodriguez-Quinones, M. A. Quail, J. R. Guest et S. C. Andrews.** 2010. Induction of the ferritin gene (*ftnA*) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Molecular Microbiology* 75 (3):637-57.
- Negre, V. L., S. Bonacorsi, S. Schubert, P. Bidet, X. Nassif et E. Bingen.** 2004. The siderophore receptor IronN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infection and Immunity* 72 (2):1216-20.
- Neilands, J. B.** 1981. Microbial iron compounds. *Annual Review of Biochemistry* 50:715-31.
- Niederhoffer, E. C., C. M. Naranjo, K. L. Bradley et J. A. Fee.** 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *Journal of Bacteriology* 172 (4):1930-8.
- O'Brien, I. G. et F. Gibson.** 1970. The structure of enterochelin and related 2,3-dihydroxy-N-benzoylserine conjugates from *Escherichia coli*. *Biochimica and Biophysica Acta* 215 (2):393-402.

- Ochsner, U. A., A. I. Vasil et M. L. Vasil.** 1995. Role of the ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* in the regulation of siderophores and exotoxin A expression: purification and activity on iron-regulated promoters. *Journal of Bacteriology* 177 (24):7194-201.
- Oelschlaeger, T. A., U. Dobrindt et J. Hacker.** 2002. Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents* 19 (6):517-21.
- Oglesby, A. G., E. R. Murphy, V. R. Iyer et S. M. Payne.** 2005. Fur regulates acid resistance in *Shigella flexneri* via RyhB and ydeP. *Molecular Microbiology* 58 (5):1354-67.
- Outten, F. W., O. Djaman et G. Storz.** 2004. A suf operon requirement for Fe-S cluster assembly during iron starvation in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 52 (3):861-72.
- Ozenberger, B. A., M. S. Nahlik et M. A. McIntosh.** 1987. Genetic organization of multiple fep genes encoding ferric enterobactin transport functions in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 169 (8):3638-46.
- Palyada, K., D. Threadgill et A. Stintzi.** 2004. Iron acquisition and regulation in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 186 (14):4714-29.
- Patzer, S. I. et K. Hantke.** 2001. Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the mntH gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 183 (16):4806-13.
- Payne, S. M. et Alexandra R. Mey.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*, *Shigella*, and *Salmonella*. In *Iron transport in bacteria*: ASM ; Oxford : John Wiley, Washington, D.C.
- Payne, S. M., E. E. Wyckoff, E. R. Murphy, A. G. Oglesby, M. L. Boulette et N. M. Davies.** 2006. Iron and pathogenesis of *Shigella*: iron acquisition in the intracellular environment. *Biometals* 19 (2):173-80.
- Pecqueur, L., B. D'Autreaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. Michaud-Soret et B. Bersch.** 2006. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *The Journal of Biological Chemistry* 281 (30):21286-95.

- Perry, R. D.** 2004. *Yersinia*. In *Iron transport in bacteria*: ASM Press, Washington, D. C.
- Perry, R. D., P. B. Balbo, H. A. Jones, J. D. Fetherston et E. DeMoll.** 1999. Yersiniabactin from *Yersinia pestis*: biochemical characterization of the siderophore and its role in iron transport and regulation. *Microbiology* 145 ( Pt 5):1181-90.
- Piddock, L. J.** 2006. Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology* 4 (8):629-36.
- Pomposiello, P. J. et B. Demple.** 2001. Redox-operated genetic switches: the SoxR and OxyR transcription factors. *Trends in Biotechnology* 19 (3):109-14.
- Prevost, K., H. Salvail, G. Desnoyers, J. F. Jacques, E. Phaneuf et E. Masse.** 2007. The small RNA RyhB activates the translation of shiA mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Molecular Microbiology* 64 (5):1260-73.
- Quail, M. A., P. Jordan, J. M. Grogan, J. N. Butt, M. Lutz, A. J. Thomson, S. C. Andrews et J. R. Guest.** 1996. Spectroscopic and voltammetric characterisation of the bacterioferritin-associated ferredoxin of *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 229 (2):635-42.
- Rama, G., D. K. Chhina, R. S. Chhina et S. Sharma.** 2005. Urinary tract infections-microbial virulence determinants and reactive oxygen species. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 28 (5-6):339-49.
- Rashid, R. A., P. I. Tarr et S. L. Moseley.** 2006. Expression of the *Escherichia coli* IrgA homolog adhesin is regulated by the ferric uptake regulation protein. *Microbial Pathogenesis* 41 (6):207-17.
- Rasko, D. A., J. A. Phillips, X. Li et H. L. Mobley.** 2001. Identification of DNA sequences from a second pathogenicity island of uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: probes specific for uropathogenic populations. *The Journal of Infectious Diseases* 184 (8):1041-9.
- Ratledge, C. et L. G. Dover.** 2000. Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annual Review of Microbiology* 54:881-941.

- Rea, R. B., C. G. Gahan et C. Hill.** 2004. Disruption of putative regulatory loci in *Listeria monocytogenes* demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infection and Immunity* 72 (2):717-27.
- Reigstad, C. S., S. J. Hultgren et J. I. Gordon.** 2007. Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *The Journal of Biological Chemistry* 282 (29):21259-67.
- Ridley, K. A., J. D. Rock, Y. Li et J. M. Ketley.** 2006. Heme utilization in *Campylobacter jejuni*. *Journal of Bacteriology* 188 (22):7862-75.
- Rogers, M. B., J. A. Sexton, G. J. DeCastro et S. B. Calderwood.** 2000. Identification of an operon required for ferrichrome iron utilization in *Vibrio cholerae*. *Journal of Bacteriology* 182 (8):2350-3.
- Ronald, A.** 2002. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American Journal of Medicine* 113 Suppl 1A:14S-19S.
- Ronald, A. R., L. E. Nicolle, E. Stamm, J. Krieger, J. Warren, A. Schaeffer, K. G. Naber, T. M. Hooton, J. Johnson, S. Chambers et V. Andriole.** 2001. Urinary tract infection in adults: research priorities and strategies. *International journal of antimicrobial agents* 17 (4):343-8.
- Russo, T. A., U. B. Carlino, A. Mong et S. T. Jodush.** 1999. Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infection and Immunity* 67 (10):5306-14.
- Russo, T. A. et J. R. Johnson.** 2000. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases* 181 (5):1753-4.
- Russo, T. A. et J. R. Johnson.** 2003. Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection* 5 (5):449-56.
- Russo, T. A., C. D. McFadden, U. B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan, T. J. Barnard et J. R. Johnson.** 2002. IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 70 (12):7156-60.
- Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd et C. M. Dozois.** 2008. Contribution of the

SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain chi7122. *Infection and Immunity* 76 (2):601-11.

**Sabri, M., S. Houle et C. M. Dozois.** 2009. Roles of the extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* ZnuACB and ZupT zinc transporters during urinary tract infection. *Infection and Immunity* 77 (3):1155-64.

**Sabri, M., S. Leveille et C. M. Dozois.** 2006. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology* 152 (Pt 3):745-58.

**Salvail, H., P. Lanthier-Bourbonnais, J. M. Sobota, M. Caza, J. A. Benjamin, M. E. Mendieta, F. Lepine, C. M. Dozois, J. Imlay et E. Masse.** 2010. A small RNA promotes siderophore production through transcriptional and metabolic remodeling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (34):15223-8.

**Schaeffer, A. J., N. Rajan, Q. Cao, B. E. Anderson, D. L. Pruden, J. Sensibar et J. L. Duncan.** 2001. Host pathogenesis in urinary tract infections. *International journal of antimicrobial agents* 17 (4):245-51.

**Schaible, U. E. et S. H. Kaufmann.** 2004. Iron and microbial infection. *Nature Reviews Microbiology* 2 (12):946-53.

**Schellhorn, H. E.** 1995. Regulation of hydroperoxidase (catalase) expression in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters* 131 (2):113-9.

**Schilling, J. D., M. A. Mulvey et S. J. Hultgren.** 2001. Dynamic interactions between host and pathogen during acute urinary tract infections. *Urology* 57 (6 Suppl 1):56-61.

**Schubert, S., S. Cuenca, D. Fischer et J. Heesemann.** 2000. High-pathogenicity island of *Yersinia pestis* in enterobacteriaceae isolated from blood cultures and urine samples: prevalence and functional expression. *The Journal of Infectious Diseases* 182 (4):1268-71.

**Schubert, S., B. Picard, S. Gouriou, J. Heesemann et E. Denamur.** 2002. Yersinia high-pathogenicity island contributes to virulence in *Escherichia coli* causing extraintestinal infections. *Infection and Immunity* 70 (9):5335-7.

**Schwartz, C. J., J. L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F. J. Ruzicka, H. Beinert et P. J. Kiley.** 2001. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor,

represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (26):14895-900.

**Simon, R.** 1984. High frequency mobilization of gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. *Molecular and General Genetics* 196 (3):413-20.

**Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockett, D. E. Johnson, M. S. Donnenberg, R. A. Welch et H. L. Mobley.** 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infection and Immunity* 72 (11):6373-81.

**Stentz, R., A. Weintraub et G. Widmalm.** 2006. The structures of *Escherichia coli* O-polysaccharide antigens. *FEMS Microbiology Reviews* 30 (3):382-403.

**Stoebner, J. A. et S. M. Payne.** 1988. Iron-regulated hemolysin production and utilization of heme and hemoglobin by *Vibrio cholerae*. *Infection and Immunity* 56 (11):2891-5.

**Stojiljkovic, I., M. Cobeljic et K. Hantke.** 1993. *Escherichia coli* K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine. *FEMS Microbiology Letters* 108 (1):111-5.

**Stojiljkovic, I. et K. Hantke.** 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Molecular and General Genetics* 247 (2):199-205.

**Storz, G. et J. A. Imlay.** 1999. Oxidative stress. *Current Opinion in Microbiology* 2 (2):188-94.

**Storz, G., L. A. Tartaglia et B. N. Ames.** 1990. The OxyR regulon. *Antonie van Leeuwenhoek* 58 (3):157-61.

**Storz, G. et M. Zheng.** 2000. Oxidative Stress. In *Bacterial Stress Response*. Washington, D.C.: ASM press.

**Sussman, Max.** 1997. *Escherichia coli* and human disease. In *Escherichia coli : Mechanisms of virulence*, edited by M. Sussman: Cambridge University Press.

- Takahashi, Y. et M. Nakamura.** 1999. Functional assignment of the ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3 gene cluster involved in the assembly of Fe-S clusters in *Escherichia coli*. *Journal of Biochemistry* 126 (5):917-26.
- Torres, A. G. et S. M. Payne.** 1997. Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* 23 (4):825-33.
- Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch et S. M. Payne.** 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity* 69 (10):6179-85.
- Touati, D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard et S. Despied.** 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *Journal of Bacteriology* 177 (9):2305-14.
- Tree, J. J., G. C. Ulett, C. L. Ong, D. J. Trott, A. G. McEwan et M. A. Schembri.** 2008. Trade-off between iron uptake and protection against oxidative stress: deletion of *cueO* promotes uropathogenic *Escherichia coli* virulence in a mouse model of urinary tract infection. *Journal of Bacteriology* 190 (20):6909-12.
- Tseng, H. J., Y. Srikhanta, A. G. McEwan et M. P. Jennings.** 2001. Accumulation of manganese in *Neisseria gonorrhoeae* correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity. *Molecular Microbiology* 40 (5):1175-86.
- Tsolis, R. M., A. J. Baumler, F. Heffron et I. Stojiljkovic.** 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infection and Immunity* 64 (11):4549-56.
- Ulett, G. C., J. Valle, C. Beloin, O. Sherlock, J. M. Ghigo et M. A. Schembri.** 2007. Functional analysis of antigen 43 in uropathogenic *Escherichia coli* reveals a role in long-term persistence in the urinary tract. *Infection and Immunity* 75 (7):3233-44.
- Valdebenito, M., S. I. Muller et K. Hantke.** 2007. Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin). *FEMS Microbiology Letters* 277 (2):182-7.
- Vecerek, B., I. Moll et U. Blasi.** 2007. Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding. *The EMBO Journal* 26 (4):965-75.

- Walsh, C. T. et C. G. Marshall.** 2004. Siderophore biosynthesis in bacteria. In *Iron transport in bacteria*. Washington D.C.: ASM Press.
- Wandersman, C. et I. Stojiljkovic.** 2000. Bacterial heme sources: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current Opinion in Microbiology* 3 (2):215-20.
- Wassarman, K. M., F. Repoila, C. Rosenow, G. Storz et S. Gottesman.** 2001. Identification of novel small RNAs using comparative genomics and microarrays. *Genes and Development* 15 (13):1637-51.
- Watnick, P. I., T. Eto, H. Takahashi et S. B. Calderwood.** 1997. Purification of *Vibrio cholerae fur* and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Bacteriology* 179 (1):243-7.
- Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, 3rd, P. Redford, P. Roesch, D. Rasko, E. L. Buckles, S. R. Liou, A. Boutin, J. Hackett, D. Stroud, G. F. Mayhew, D. J. Rose, S. Zhou, D. C. Schwartz, N. T. Perna, H. L. Mobley, M. S. Donnenberg et F. R. Blattner.** 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (26):17020-4.
- Wells, T. J., J. J. Tree, G. C. Ulett et M. A. Schembri.** 2007. Autotransporter proteins: novel targets at the bacterial cell surface. *FEMS Microbiology Letters* 274 (2):163-72.
- Whipp, M. J., H. Camakaris et A. J. Pittard.** 1998. Cloning and analysis of the *shiA* gene, which encodes the shikimate transport system of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 209 (1-2):185-92.
- Whitfield, C. et I. S. Roberts.** 1999. Structure, assembly and regulation of expression of capsules in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* 31 (5):1307-19.
- Wilderman, P. J., N. A. Sowa, D. J. FitzGerald, P. C. FitzGerald, S. Gottesman, U. A. Ochsner et M. L. Vasil.** 2004. Identification of tandem duplicate regulatory small RNAs in *Pseudomonas aeruginosa* involved in iron homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (26):9792-7.

- Wiles, T. J., R. R. Kulesus et M. A. Mulvey.** 2008. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* 85 (1):11-9.
- Wilks, K. E., K. L. Dunn, J. L. Farrant, K. M. Reddin, A. R. Gorringer, P. R. Langford et J. S. Kroll.** 1998. Periplasmic superoxide dismutase in meningococcal pathogenicity. *Infection and Immunity* 66 (1):213-7.
- Williams, P. H.** 1979. Novel iron uptake system specified by ColV plasmids: an important component in the virulence of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 26 (3):925-32.
- Williams, P. H. et N. H. Carbonetti.** 1986. Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 51 (3):942-7.
- Williams, P. H. et P. J. Warner.** 1980. ColV plasmid-mediated, colicin V-independent iron uptake system of invasive strains of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 29 (2):411-6.
- Winkelmann, G., A. Cansier, W. Beck et G. Jung.** 1994. HPLC separation of enterobactin and linear 2,3-dihydroxybenzoylserine derivatives: a study on mutants of *Escherichia coli* defective in regulation (*fur*), esterase (*fes*) and transport (*fepA*). *Biometals : an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine* 7 (2):149-54.
- Woodmansee, A. N. et J. A. Imlay.** 2002. Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (37):34055-66.
- Wooldridge, K. G., J. A. Morrissey et P. H. Williams.** 1992. Transport of ferric-aerobactin into the periplasm and cytoplasm of *Escherichia coli* K12: role of envelope-associated proteins and effect of endogenous siderophores. *Journal of General Microbiology* 138 (3):597-603.
- Wu, J. et B. Weiss.** 1992. Two-stage induction of the SoxRS (superoxide response) regulon of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 174 (12):3915-20.
- Yamanaka, H., H. Kobayashi, E. Takahashi et K. Okamoto.** 2008. MacAB is involved in the secretion of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin II. *Journal of Bacteriology* 190 (23):7693-8.

- Zaharik, M. L., B. A. Vallance, J. L. Puente, P. Gros et B. B. Finlay.** 2002. Host-pathogen interactions: Host resistance factor Nrampl up-regulates the expression of *Salmonella* pathogenicity island-2 virulence genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (24):15705-10.
- Zhang, A., S. Altuvia et G. Storz.** 1997. The novel oxyS RNA regulates expression of the sigma s subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Nucleic Acids Symposium Series* (36):27-8.
- Zhao, G., P. Ceci, A. Ilari, L. Giangiacomo, T. M. Laue, E. Chiancone et N. D. Chasteen.** 2002. Iron and hydrogen peroxide detoxification properties of DNA-binding protein from starved cells. A ferritin-like DNA-binding protein of *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry* 277 (31):27689-96.
- Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider et G. Storz.** 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *Journal of Bacteriology* 181 (15):4639-43.
- Zheng, M., X. Wang, L. J. Templeton, D. R. Smulski, R. A. LaRossa et G. Storz.** 2001. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *Journal of Bacteriology* 183 (15):4562-70.
- Zhou, Y. et J. Xie.** 2011. The roles of pathogen small RNAs. *Journal of Cellular Physiology* 226 (4):968-73.