

Thèse de doctorat en biologie.

**Étude sur l'importance relative des transporteurs des cations divalents
du zinc, fer et manganèse dans la virulence des souches extra-intestinales
pathogènes d'*Escherichia coli* (ExPEC).**

Auteur : Mourad Sabri.

Institut National de la Recherche Scientifique

Institut Armand-Frappier

Laval, Québec, Canada

Juillet 2008

Introduction	1
Les métaux dans le métabolisme cellulaire, le métallome:	2
Le contexte de l'étude, les souches ExPEC et leurs transporteurs de métaux :	5
Objectifs de l'étude :	7
Organisation du texte de la thèse :	8
<i>Escherichia coli</i>	9
La bactérie à l'étude, <i>Escherichia coli</i> :	10
Taxonomie d'<i>E. coli</i> :	11
Diversité, versatilité et clonalité d'<i>E. coli</i> :	11
Adaptation aux différents hôtes :	12
Les différents types de virulence des souches d'<i>E. coli</i> :	12
Importance du transfert horizontal dans l'évolution de la virulence :	13
Îlots de pathogénicité :	13
Plasmides de virulence :	14
Les divers types de facteurs de virulence :	14
Les facteurs de virulence chez <i>E. coli</i> :	16
Le zinc	19
Caractéristiques physico-chimiques du zinc :	20
Le zinc dans la biologie:	20
Le zinc chez l'hôte:	21
Transporteurs eucaryotes du zinc:	22
Homéostasie eucaryote du zinc:	23
Le zinc et l'immunité:	23
Le zinc chez les bactéries:	25
L'homéostasie bactérienne du zinc :	26
Transporteurs bactériens du zinc:	34
Entrée du Zn²⁺ dans la cellule bactérienne:	35
ZnuACB fonctionnement et régulation:	36

ZupT:	44
Résistance à la toxicité du zinc:	46
Transporteurs d'efflux de Zn²⁺:	47
ZntA fonctionnement et régulation:	47
Importance de Zn²⁺ lors de l'infection bactérienne:	49
Le fer	51
Caractéristiques physico-chimiques du fer:	52
Le fer dans la biologie:	52
Le fer chez l'hôte:	53
Transporteurs eucaryotes du fer:	54
Entreposage du fer chez les eucaryotes:	56
Homéostasie eucaryote du fer:	56
Le fer et l'immunité:	58
Le fer chez les bactéries:	58
Transporteurs bactériens du fer:	59
Entrée du fer dans la cellule bactérienne:	59
Les sidérophores:	59
FeoABC:	62
SitABCD:	64
Autres transporteurs de fer:	65
Entreposage du fer chez les bactéries:	65
L'homéostasie bactérienne du fer	66
Le fer et le stress oxydatif:	69
Importance du fer lors de l'infection bactérienne:	73
Le manganèse	74
Caractéristiques physicochimiques du manganèse :	75
Le manganèse dans la biologie:	75
Le manganèse chez l'hôte:	76
Transporteurs eucaryotes du manganèse:	76
Homéostasie eucaryote du manganèse:	77

Le manganèse et l'immunité:	77
Le manganèse chez les bactéries:	78
Transporteurs bactériens du manganèse :	80
MntH :	80
SitABCD :	81
ZupT :	82
L'homéostasie bactérienne du manganèse:	83
Le manganèse et la résistance au stress oxydatif:	84
Importance du manganèse lors de l'infection bactérienne:	85
Les transporteurs ABC	87
Perméases ABC:	88
Perméases ABC d'<i>E. coli</i>:	88
Importances des perméases ABC:	89
Conclusion de la revue de la littérature:	90
Publications : procédures expérimentales et résultats.	94
Article 1:	95
Article 2:	129
Article 3:	167
Discussion:	206
Croissance d'<i>E. coli</i> et transporteurs de cations Mn^{2+}, Fe^{2+} et Zn^{2+}:	207
Les caractéristiques des transporteurs étudiés:	210
Stress oxydatif:	214
Motilité:	217
Virulence:	218
Transporteurs ABC et transporteurs dépendants du gradient chimiosmotique:	219
Synthèse de la discussion:	222
Perspectives:	223
Inactiver les transporteurs ABC:	223

Utiliser les souches mutantes en tant que vaccin vivant atténué:	224
Conclusion:	226
Annexe 1: Liste des abréviations utilisées dans le texte.	230
Annexe 2: Liste des affiches et présentations orales.	234
Annexe 4: Contribution de l'étudiant.	236
Remerciements:	238
Le mot de la fin :	240
Références bibliographiques:	242

Avant-propos:

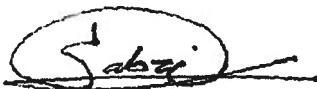
Cette thèse n'aurait pas vu le jour sans la réunion d'un certain nombre de facteurs favorables. Parmi ceux-ci, le premier est mon intérêt pour les systèmes vivants, dont les bactéries en général sont un magnifique exemple et *Escherichia coli*, un digne représentant.

Le second facteur est la chance qui m'a été donnée de pouvoir me joindre au laboratoire de Dr. Charles M. Dozois. Dans ce laboratoire j'ai appris ce que je connais actuellement de la biologie moléculaire appliquée à *Escherichia coli*. J'y ai aussi acquis certaines qualités nécessaires à une carrière en recherche scientifique. Parmi celles-ci, la patience face aux difficultés inhérentes au processus expérimental est sans aucun doute la plus importante. Charles a aussi été un excellent exemple de scientifique dévoué à sa tâche et acharné au travail. Il a été d'un soutien précieux.

Le troisième facteur est le soutien patient et dévoué de toute ma famille et en particulier de ma femme Kim.

Sommaire :

Les ions métalliques du zinc, manganèse et fer jouent des rôles importants dans les systèmes biologiques. Entant que cofacteurs enzymatiques ou éléments structuraux des protéines, ces ions contribuent au métabolisme cellulaire. Lors du processus infectieux, il y a compétition pour ces ions métalliques entre les bactéries pathogènes et l'organisme hôte. Les bactéries pathogènes ont acquis de par l'évolution ou par transfert horizontal, les transporteurs nécessaires à l'acquisition de ces ions métalliques. Chez les souches pathogènes extra-intestinales d'*Escherichia coli*, les transporteurs des ions divalents de ces métaux appartiennent à trois familles fonctionnelles se distinguant par leur source de l'énergie et l'architecture moléculaire. Il s'agit des perméases ABC Znu et Sit, des transporteurs dépendants d'un gradient chimiosmotique MntH et ZupT, et de la GTP-ase de transport Feo. Parmi ces transporteurs Sit est pathospécifique, alors que les autres transporteurs sont partagés entre les souches ExPEC et les souches commensales d'*E. coli*. L'étude des mutants déficients dans l'utilisation d'un ou plusieurs de ces transporteurs, permet de définir les transporteurs ABC comme étant la famille la plus importante de transporteurs des ions divalents de fer, manganèse et zinc *in vivo*. Par ailleurs, le transport de manganèse et de zinc divalents apparaît comme étant au moins aussi important que le transport du fer divalent pour la pathogénese des ExPEC.



Signature de l'étudiant.



Signature du directeur de recherche.

I Introduction

I a Les métaux dans le métabolisme cellulaire, le métallome:

Les réactions biochimiques sont au cœur même du vivant. L'ensemble de l'anabolisme, du catabolisme et de l'interaction des biomolécules forme le métabolisme. L'ensemble des réactions métaboliques et des métabolites produits par le métabolisme est nommé métabolome. L'unité de base du vivant, au niveau de laquelle le métabolisme apparaît sous sa forme intégrée est la cellule. La vie cellulaire est impossible sans les réactions métaboliques complexes. [1]

Un certain nombre d'éléments chimiques sont nécessaires pour le maintien du métabolisme cellulaire. Bien que des différences existent entre les différents types de cellules, on considère que la liste des éléments indispensables pour le métabolisme de leur immense majorité, inclut les éléments suivants : H, C, O, N, P, S, Cl, Na, Ca, K, Mg, Se, Zn, Fe, Mn, Cu, Co, Ni et Mo. [2] Ces éléments ont été sélectionnés au cours de l'évolution, car leurs propriétés physicochimiques permettaient le fonctionnement optimal des diverses réactions biochimiques qui rendent possible la vie. [2-6]

Une bonne partie de ces éléments chimiques indispensables sont des métaux. R.J.P. Williams a proposé de nommer l'ensemble des ions métalliques d'une cellule un métallome, par analogie avec l'ensemble des réactions métaboliques (métabolome), de l'information génétique (génome), de l'ensemble des gènes transcrits (transcriptome) et de l'ensemble des protéines (protéome). [6] Il a décrit cet ensemble comme pouvant être subdivisé en plusieurs sous-groupes. On peut ainsi distinguer les ions métalliques liés à des produits de sécrétion cellulaire dans l'espace extracellulaire (ex. liaison du Fe^{3+} aux sidérophores sécrétés), des ions métalliques associés à la membrane cellulaire (ex. au niveau des récepteurs), les ions en transit à travers la membrane cytoplasmique (grâce à des transporteurs), les ions coordonnés par les protéines et autres ligands cytoplasmiques d'un poids moléculaire élevé (ex. acides nucléiques et enzymes) ainsi que le bassin labile des ions métalliques libres ou chélatés par de ligands cytoplasmiques de faible poids moléculaire (ex. ATP). De plus, le métallome d'une cellule peut changer de composition en fonction des besoins physiologiques de la cellule et de la disponibilité des ions métalliques dans le milieu extracellulaire. [2] Enfin, le métallome porterait l'empreinte de l'évolution du vivant, puisque l'usage et la concentration relative en ions métalliques divergent entre les eucaryotes, archéobactéries et eubactéries. [7]

Les propriétés physicochimiques des métaux permettent, à de rares exceptions près, de former des complexes avec des ligands organiques. Parmi les ligands présentant le plus d'affinité envers les ions métalliques on retrouve certains acides aminés et il n'est donc pas étonnant que les ions métalliques forment des complexes avec diverses protéines. [8] Les protéines s'associant avec des ions

métalliques sont collectivement nommées métalloprotéines. Selon Haraguchi, le métallome devrait d'ailleurs être vu comme étant l'ensemble des métalloprotéines d'une cellule ou d'un tissu. [9] De nombreuses protéines jouant un rôle structurel ou enzymatique de premier plan sont dépendantes des ions métalliques et les métalloprotéines jouent un rôle important dans le métabolisme cellulaire. Les enzymes qui dépendent des cofacteurs métalliques sont nommés métallo-enzymes et sont un groupe important et diversifié de métalloprotéines sans lesquelles le maintien du métabolome, du génome, du transcriptome et du protéome serait impossible. [10-12] La vie cellulaire ne peut tout simplement pas exister en absence des ions métalliques appropriés. Le milieu extracellulaire est parfois appauvri en certains ions métalliques indispensables, ou encore surabondant en ions métalliques indésirables. [13, 14] Un approvisionnement cellulaire adéquat en ions indispensables et le rejet des ions indésirables, sont primordiaux pour la survie cellulaire. Tous les métaux capables de s'associer avec des composés biologiques ne sont pas nécessairement bénéfiques, bien au contraire, certains métaux sont hautement toxiques. [15] Même ceux jouant un rôle bénéfique dans la physiologie cellulaire peuvent devenir toxiques s'ils sont présents à des concentrations excédentaires. [16, 17] Les cellules ont donc développé des mécanismes leur permettant de limiter l'entrée des métaux qui leur sont néfastes, tout en s'assurant d'obtenir les métaux qui leur sont bénéfiques à une concentration appropriée. [18, 19]

Les transporteurs spécifiques, dédiés à l'acquisition de métaux, permettent aux cellules de survivre même dans les milieux très appauvris, en accumulant des concentrations en ions métalliques supérieures de plusieurs ordres de grandeur à celles disponibles dans le milieu extracellulaire. [16, 20, 21] Certains métaux sont donc appelés des éléments traces, puisque de très faibles concentrations extracellulaires de ces ions métalliques suffisent à assurer la survie des cellules. [22]

Évidemment, des transporteurs aussi efficaces nécessitent des dépenses en énergie et peuvent entraîner une surdose en métaux. [23] Le transport des métaux à partir du milieu extracellulaire est donc contrôlé de façon précise grâce à des protéines régulatrices qui répriment l'expression des transporteurs quand la concentration intracellulaire d'un métal donné est suffisante. [24-26] Des circuits de régulation impliquant des ARN régulateurs de petite taille, permettent également d'induire l'expression des transporteurs quand le métal indispensable est insuffisant dans la cellule. [27] De plus, dans le cas de la surdose toxique d'un métal, des protéines régulatrices vont promouvoir l'expression des transporteurs chargés de rejeter le métal indésirable vers le milieu extracellulaire. [28] Ainsi, certaines cellules bactériennes seront capables de survivre même dans des milieux fortement pollués par des métaux lourds toxiques.

On considère actuellement que seuls quelques rares métaux sont absolument indispensables à tous les organismes vivants, il s'agit de Cu, K, Mg, Mn, Mo et Zn (le métalloïde K^+ étant le cation

cytoplasmique le plus nombreux). [2, 5, 6] Dans le cas de la majorité des organismes vivants il faut rajouter Fe à cette courte liste, bien que certains microorganismes semblent en être venus à remplacer, partiellement ou totalement, le fer par d'autres métaux (surtout Mn et Zn). [16, 20, 29, 30] De multiples transporteurs cellulaires, appartenant à des familles différant par leur architecture protéique, la source de l'énergie utilisée et leur mécanisme de transport, sont responsables de l'import de ces métaux. [16, 21, 31]

Les métaux absolument indésirables, car hautement toxiques et inutilisables dans le métabolisme cellulaire, sont surtout As, Cr, Hg et Pb. Il faut ajouter à cela Cd qui est rejeté par la majorité des cellules et ne présente actuellement qu'une seule activité connue en tant que cofacteur enzymatique. De nombreux transporteurs sont dédiés à l'export de ces métaux à l'extérieur de la cellule et des protéines senseurs permettent de maintenir leurs concentrations cellulaires dans les limites du supportable. [14, 19]

Il est à noter que les métaux indispensables : Fe, Cu, Mg, Mn, Mo et Zn appartiennent tous au groupe dit des métaux de transition. [32] Les métaux de transition jouent un rôle prépondérant dans le métallome. Ce rôle s'explique d'une part par la capacité de Fe, Mg, Mn et Mo de subir des changements de potentiel Redox en gagnant ou en perdant des électrons et d'autre part pour Cu et Zn par leur chimie de Lewis. [33-38]

Ces caractéristiques physicochimiques ont permis l'évolution de très nombreux systèmes enzymatiques, dans lesquels les ions de ces métaux sont associés à un environnement protéique qui affine leurs propriétés afin de catalyser de multiples réactions biochimiques. Les cofacteurs métalliques enzymatiques sont coordonnés par leurs ligands protéiques d'une façon qui leur permet soit d'interagir directement avec le substrat, ou encore d'interagir avec une molécule intermédiaire qui à son tour transformera le substrat de la réaction biochimique en produit final de la catalyse. Dans les deux cas l'architecture des métallo-enzymes a évolué de façon à favoriser ces interactions et augmenter la spécificité de celles-ci. [34, 39-41]

Parmi les métaux indésirables, Cd, Cr, Hg et Pb appartiennent aussi au groupe des métaux de transition. Leur toxicité s'expliquerait en partie par leur capacité à se substituer aux métaux de transition indispensables dans les sites catalytiques des métallo-enzymes en inactivant celles-ci. [14]

Les transporteurs permettant l'acquisition des ions métalliques se trouvent à l'interface du métallome et du milieu extracellulaire. C'est au niveau de cette interface que se passe la sélection et l'accumulation des métaux acquis à partir du milieu environnant par la cellule. [6] Les transporteurs des ions métalliques qui permettent la constitution du métallome sont importants pour la survie cellulaire. Et cette importance est maximale dans le cas des bactéries pathogènes évoluant dans le

milieu interne de l'organisme hôte. [16, 20] En effet, la privation de l'agent pathogène en ions métalliques est l'une des stratégies utilisées par l'immunité innée dans sa lutte contre les infections. [42-45] Nous proposons une représentation schématique d'un métallome dans la figure 1.

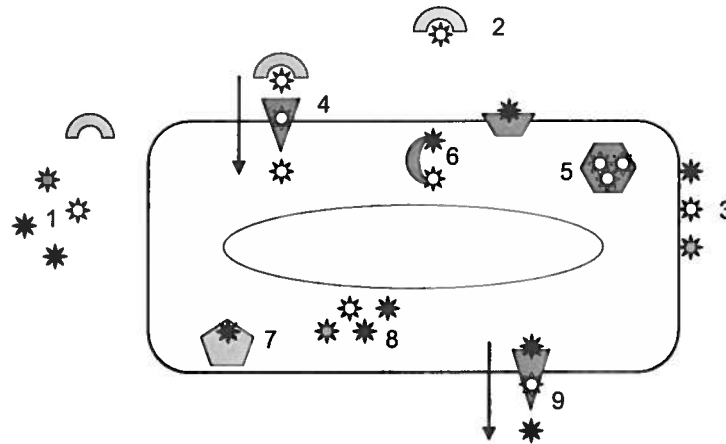


Fig.1 : Représentation schématique du métallome. (1) Ions métalliques dans l'espace extracellulaire. (2) Ions liés aux chélateurs excrétés par la cellule (exp. Sidérophores) (3) Ions liés à la membrane externe de la cellule. (4) Ions métalliques transportés par des transporteurs spécifiques. (5) Ions métalliques entreposés dans des protéines spécifiques (métallothionéines, bactérioferritines, ferritines, etc.) (6) Ions métalliques utilisés en tant que cofacteurs dans des métallo-enzymes. (7) Ions métalliques jouant un rôle structural dans des métalloprotéines (8) Ensemble labile des ions métalliques dans le cytoplasme, ces ions sont soit libres, soit liés à des ligands de faible poids moléculaire. (9) Efflux des ions métalliques toxiques ou excédentaires excrétés à travers un transporteur.

I b Le contexte de l'étude, les souches ExPEC et leurs transporteurs de métaux :

Nous avons entrepris notre étude afin de définir certains aspects de l'interaction ayant lieu à l'interface du métallome bactérien et du milieu interne des organismes hôtes vertébrés. Dans le cadre de notre étude, nous avons choisi de nous intéresser au rôle des transporteurs des cations divalents des métaux de transition Fe, Mn et Zn dans la virulence des souches extra-intestinales pathogènes d'*Escherichia coli* (ExPEC). [46]

Les souches ExPEC représentent un modèle intéressant de pathogenèse bactérienne car elles causent un large éventail d'infections extra-intestinales chez l'humain et les animaux. Ainsi des souches extra-intestinales humaines dites UPEC (pour *uropathogenic E. coli*) sont responsables de la majorité des infections urinaires, alors que des souches aviaires dites APEC (pour *avian pathogenic E. coli*) causent des infections respiratoires évoluant rapidement vers une septicémie. [47-49] Les infections dues aux ExPEC causent des conséquences graves sur le plan de la santé humaine et animale et entraînent un coût économique et social élevés. [50] Par conséquent, en dehors de son intérêt purement académique, notre étude avait aussi pour but de contribuer à la compréhension des mécanismes de la pathogenèse des ExPEC, une compréhension indispensable pour la lutte contre les infections causées par ces souches.

Comme nous l'avons indiqué précédemment, lors de l'infection il s'établit une compétition pour les ions métalliques indispensables, dont Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} , entre les cellules bactériennes infectieuses et les cellules de l'hôte. Plusieurs raisons nous ont amené à privilégier l'étude de l'importance de ces ions pour la virulence. Avant tout, ces cations sont des cofacteurs des systèmes de détoxification des sous-produits réactifs d'oxygène qui sont utilisés par les cellules immunitaires pour tuer les pathogènes. [51-53] De plus, leurs transporteurs chez *E. coli* ou dans des espèces bactériennes apparentées sont identifiés mais non caractérisés de façon exhaustive. [16, 21, 31] Enfin, leur importance pour la virulence des souches pathogènes extra-intestinales d'*E. coli* n'est pas documentée, même si des études ont montré chez d'autres espèces bactériennes que des transporteurs homologues pourraient être importants pour la virulence et que l'acquisition de certains de ces ions est indispensable *in vivo*. [54-59] En utilisant des souches d'*E. coli* K-12 MG1655 et χ 289, UPEC CFT073 et APEC χ 7122 en tant que bactéries modèles nous avons décidé d'éclaircir et de préciser les aspects mal connus de l'interrelation entre le processus du transport de ces ions et la virulence bactérienne.

Plusieurs transporteurs sont aptes à assurer l'entrée de ces ions dans le cytoplasme des souches ExPEC. Chacun de ces transporteurs est exprimé de façon régulée en fonction de divers stimuli environnementaux. [60-62] Ces transporteurs qui appartiennent à des familles différentes ont parfois des affinités de transport et des mécanismes de transport mal définis. [30, 31, 63-65] Il arrive fréquemment que plusieurs transporteurs importent le même type d'ion métallique et que plus d'un type d'ion métallique soient transportés par un même transporteur. Ainsi le fer ferreux est importé par au moins deux transporteurs : FeoABC est présent chez toutes les souches d'*E. coli*, est GTP-dépendant et important surtout durant l'anaérobiose, alors que SitABCD est présent surtout chez les souches ExPEC, est ATP-dépendant et semble capable de transporter le fer même en aérobiose. [16] De même, le manganèse est transporté par SitABCD cité précédemment et par MntH qui est présent chez toutes

les souches d'*E. coli* et dépend du gradient des protons de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. [20] Quant au zinc, il est transporté par deux transporteurs : ZnuACB dépendant d'ATP et ZupT possiblement dépendant du gradient chimiosmotique des carbonates, les deux transporteurs étant présents chez toutes les souches d'*E. coli*, mais différant par leurs mécanismes de transport, leur régulation et par leurs capacités respectives de transporter d'autres métaux. [21] Nous proposons une représentation schématique des divers transporteurs abordés lors de notre étude dans la figure 2.

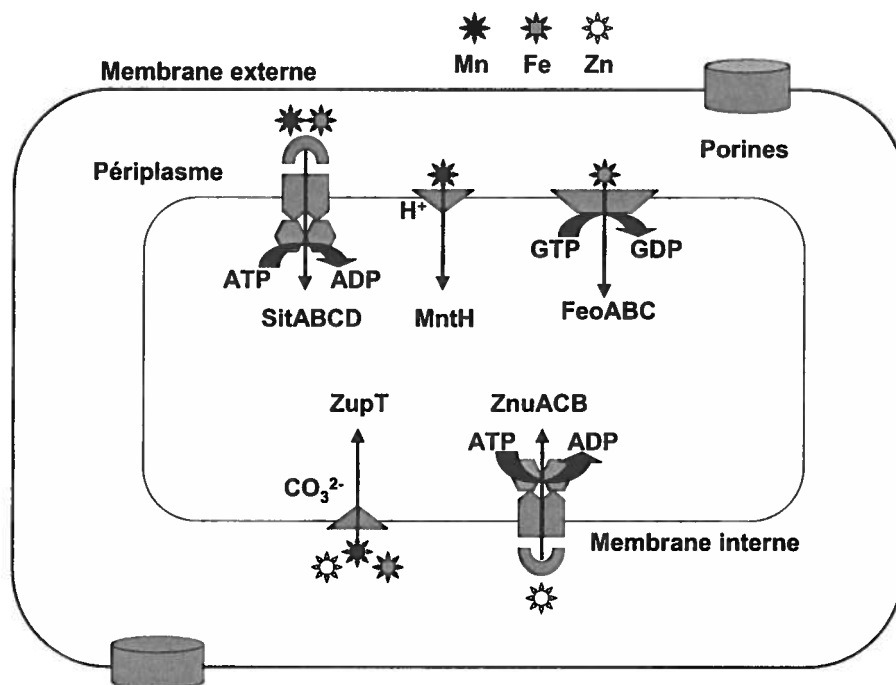


Fig.2 : Représentation schématique des transporteurs à l'étude. Les transporteurs sont indiqués avec leurs ions cibles transportés et leurs sources d'énergie. Les transporteurs font partie des familles fonctionnelles différentes et sont classés selon leur architecture protéique, leur source d'énergie et leur mécanisme de transport.

I c Objectifs de l'étude :

Il est donc possible que lors des interactions entre les ExPEC et l'organisme hôte, les importances réciproques de tous ces transporteurs lors du processus infectieux diffèrent grandement et que certains des transporteurs soient plus importants que d'autres. En entreprenant cette étude, notre objectif était de classer les ions et leurs transporteurs selon leur importance pour la virulence. En effet, étant donné qu'un seul ion est fréquemment transporté par plus d'un transporteur et que souvent les transporteurs sont capables d'importer plus d'un seul ion, nous avons émis l'hypothèse que certains

transporteurs seraient plus importants que d'autres pour la virulence des souches ExPEC et que cette importance serait due au transport d'un ion en particulier. De plus, en comparant l'impact sur la virulence ExPEC des différents transporteurs, nous espérons identifier les familles de transporteurs qui seraient des cibles thérapeutiques potentielles privilégiées dans la lutte contre les infections ExPEC. Nous espérons que les souches ExPEC ayant perdu un ou des transporteurs des ions métalliques ciblés lors de notre étude, pourraient peut-être devenir des candidates potentielles pour le rôle d'un vaccin vivant atténué contre les infections ExPEC. Enfin, nous voulions caractériser plus en profondeur certains des transporteurs à l'étude.

I d Organisation du texte de la thèse :

Dans les pages qui suivent nous allons présenter la monographie de la thèse de doctorat en biologie qui découle de quatre années de recherche et d'expérimentation. Nous avons choisi de présenter cette monographie sous la forme d'une thèse par articles. Cette thèse comprendra une revue de la littérature pertinente à notre sujet de recherche, suivie des articles que nous avons publiés ou préparés pour la publication dans des revues scientifiques et complétée par une discussion générale des résultats contenus dans les articles ce qui nous mènera à conclure sur le sujet de notre étude.

Lors de la revue de la littérature, nous allons avant tout présenter la bactérie *Escherichia coli* et décrire ses facteurs de virulence, puis nous allons poursuivre avec les propriétés physicochimiques des ions métalliques à l'étude, ainsi que les informations actuellement disponibles sur leur rôle dans la physiologie cellulaire d'*E. coli* ou d'autres espèces bactériennes apparentées. Nous allons aussi détailler ce qui est connu des mécanismes de transport, de la régulation du transport et de l'importance potentielle des transporteurs des différents ions pour la virulence. Une attention particulière sera accordée aux transporteurs ABC des cations métalliques divalents, car ces transporteurs jouent un rôle particulièrement important *in vivo*.

Dans les articles scientifiques qui font partie de cette thèse, nous allons détailler les méthodes expérimentales utilisées pour obtenir les données sur le transport des ions à l'étude par les transporteurs qui nous intéressent, les résultats qui découlent des données expérimentales obtenues et les discussions relatives aux diverses parties de notre étude avec des conclusions spécifiques à chaque partie.

Nous procéderons par la suite à une discussion globale des résultats obtenus lors de notre étude, en rappelant les points les plus importants et en énonçant une synthèse de ceux-ci, tout en définissant les perspectives pour des études futures qui pourraient être entreprises sur la base de nos résultats, avant de conclure.

II *Escherichia coli*

II a La bactérie à l'étude, *Escherichia coli* :

Escherichia coli (*E. coli*) est sans aucun doute une des espèces bactériennes les plus étudiées. Au moment d'écrire ces lignes, une recherche portant sur *Escherichia coli* sur le site du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) donne les résultats suivants; 409892 citations d'articles, 1107 livres, 55 sites Internet, 120292 séquences nucléotidiques, 522407 protéines, 34076 représentations des structures protéiques, 161548 structures tridimensionnelles détaillées des domaines protéiques et 973 génomes complets présentent des informations qui sont de près ou de loin en relation avec *E. coli*. Cette énorme quantité d'information reliée à *E. coli* fait en sorte que lors des cours et dans des articles portant sur les divers aspects de la vie bactérienne, on considère fréquemment cette espèce comme étant la bactérie Gram négative modèle.

Nul doute donc qu'il s'agît d'un microorganisme dont l'étude est reliée à des nombreux aspects de la microbiologie. En fait, nous sommes forcés d'admettre que certains seront tentés de se poser la question de la pertinence des études supplémentaires portant sur une bactérie qui a déjà été étudiée de façon aussi exhaustive. Le fait est que malgré les nombreux résultats obtenus au cours des études précédentes, *E. coli* demeure une bactérie imparfaitement caractérisée. De plus, *E. coli* est un pathogène de premier plan chez les humains et les animaux. Ceci est dû à la grande variabilité des styles de vie des diverses souches d'*E. coli*, les multiples hôtes qu'elles peuvent coloniser (et / ou infecter) ainsi que de nombreuses infections que les souches pathogènes de cette espèce bactérienne sont en mesure de causer chez leurs hôtes susceptibles respectifs.

Cette variabilité dans les stratégies de survie adoptées par diverses souches d'*E. coli* tient avant tout de la variabilité de l'information génétique au sein de cette espèce bactérienne. Cette variabilité permet à chacune de ces souches de posséder et utiliser un ensemble de facteurs indispensables à sa survie et multiplication. Chez les souches pathogènes d'*E. coli*, les gènes responsables de la capacité d'infecter leurs hôtes respectifs et de causer des pathologies spécifiques, sont associés à des îlots de pathogénicité qui sont des séquences génétiques particulières portant des gènes impliqués dans le processus infectieux. La nature des gènes encodant les facteurs de virulence, la régulation de leur expression, l'interaction des différents facteurs de virulence (dont les fonctions peuvent être redondantes) et les mécanismes exacts des diverses interactions moléculaires de ces facteurs avec l'organisme de l'hôte, sont autant de sujets d'étude lors de l'analyse de la virulence d'une bactérie pathogène. Il est à noter que certains transporteurs de métaux peuvent être considérés des facteurs de virulence potentiels puisque en leur absence, les souches pathogènes sont incapables d'établir un processus infectieux.

II b Taxonomie d'*E. coli* :

Décrite pour la première fois en 1885 par Théodore Escherich qui l'a nommé *Bacterium coli commune*, puis renommée *Escherichia coli* en 1895 par Migula, l'espèce *Escherichia coli* appartient au genre *Escherichia* de la famille des *Enterobacteriaceae* qui à son tour fait partie de l'ordre des *Enterobacteriales*, de l'embranchement des protéobactéries γ rattaché au sous règne des protéobactéries, du règne des bactéries. [66] *E. coli* est une espèce anaérobie facultative se présentant au microscope optique en tant que bâtonnet de 2 à 6 μm de long sur 1,1 à 1,5 μm de large. C'est un firmicute de coloration Gram négative, dont les plus proches parents au niveau génétique sont les bactéries des genres *Shigella* (que certains bactériologistes considèrent d'ailleurs en tant que sous-espèce du genre *Escherichia*), *Klebsiella* et *Citrobacter*. [67]

II c Diversité, versatilité et clonalité d'*E. coli*:

Escherichia coli est une espèce ubiquitaire au niveau de microflore intestinale des différents animaux et se subdivise en un ensemble de souches, dont certaines sont commensales et d'autres pathogènes. *E. coli* est une espèce versatile sur le plan de l'adaptabilité aux conditions environnementales de même qu'aux différents hôtes. Cette versatilité est due au caractère clonal de la population d'*E. coli*. En effet, celle-ci se compose de groupes clonaux qui, bien qu'ayant dans un passé reculé un ancêtre commun, ont divergé dans le courant de l'évolution. Cette divergence est avant tout due à la sélection des mutations permettant des adaptations aux conditions des niches écologiques occupées par les différents clones. De plus, la variabilité génétique est modulée par la recombinaison au sein des génomes bactériens. Enfin, le transfert horizontal des séquences génétiques, mobilisées par des éléments génétiques mobiles tels que les transposons, plasmides ou encore les phages tempérés, permet l'échange du matériel génétique entre les souches, voire même entre les espèces différentes occupant la même niche écologique. [68-70]

Tous les mécanismes évoqués contribuent au caractère hautement mosaïque des génomes des diverses souches d'*E. coli*. La plasticité de l'information génétique confère à *E. coli* un avantage évolutif évident, car elle permet à cette espèce d'occuper différentes niches écologiques et de survivre dans une variété d'environnements que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur de l'organisme hôte.

Afin de souligner la diversité des différentes souches d'*E. coli*, il est utile de rapporter les résultats obtenus lors de la comparaison des génomes complets des trois souches humaines d'*E. coli* : la souche K12 commensale MG1655, la souche pathogène urinaire CFT073 et la souche O157:H7 entérohémorragique EDL933. L'analyse bioinformatique a montré que ces trois souches n'avaient en

commun qu'environ 39% des protéines non redondantes totales, déduites à partir des séquences de leurs génomes. Seulement environ 12% des protéines étaient communes à deux souches sur trois. Enfin, environ 47% des protéines restantes étaient uniques à l'une des trois souches avec la distribution suivante : environ 8% de protéines spécifiques à MG1655, environ 18% de protéines exclusives à EDL933 et environ 21% spécifiques à CFT073. [71] Ces données illustrent l'hétérogénéité du matériel génétique de l'espèce *E. coli* et soulignent l'importance des adaptations que ce matériel génétique a subi chez les différentes souches au cours de l'évolution. Ce sont ces adaptations qui ont permis aux souches d'*E. coli* pathogènes de coloniser différentes niches anatomiques chez différents hôtes.

II d Adaptation aux différents hôtes :

Sur le plan de l'adaptation aux différents hôtes, nous avons déjà mentionné le caractère ubiquitaire d'*E. coli*. Des souches de clonalité différente infectent des hôtes distincts : par exemple les *E. coli* infectant les lapins (REPEC pour *rabbit enteropathogenic E. coli*) ou encore celles infectant la volaille (APEC pour *avian pathogenic E. coli*). Les souches appartenant à chacun de ces deux groupes forment deux ensembles distincts qui possèdent des caractéristiques génétiques spécifiques différenciant des autres groupes de souches. Elles provoquent des pathologies différentes chez deux types d'hôtes distincts : alors que les REPEC causent la diarrhée caractérisée par des lésions attachantes/effaçantes au niveau de la muqueuse intestinale des lapins, les APEC causent la colibacillose aviaire, une infection respiratoire évoluant vers une infection systémique chez la volaille. [72, 73] Lors du passage d'un hôte susceptible à un autre non susceptible, les souches perdent l'essentiel de leur potentiel pathogène, car leurs facteurs de virulence sont adaptés aux niches anatomiques d'un hôte donné. Par exemple, les adhésines peuvent être spécifiques d'un ligand cellulaire présent chez un hôte mais absent chez un autre. Ainsi une souche peut se comporter en tant que commensal inoffensif chez un hôte, mais être un pathogène virulent chez un autre. Des souches capables d'infecter un ensemble d'hôtes différents existent aussi, comme par exemple les *E. coli* provoquant la diarrhée chez l'humain et le porc, de même que des souches qui sont des commensaux sans aucun pouvoir pathogène comme les *E. coli* K-12. [74]

II e Les différents types de virulence des souches d'*E. coli* :

Du point de vue de la virulence, on distingue plusieurs groupes de souches d'*E. coli*, dont chacun est responsable d'un type particulier de processus infectieux, chez un ou plusieurs hôtes. Nous pouvons distinguer deux grands groupes de souches pathogènes d'*E. coli*, les *E. coli* intestinales ou entériques et les *E. coli* extra-intestinales. Chacun de ces deux groupes peut être subdivisé en sous-groupes causant des infections spécifiques.

Parmi les souches intestinales se classent toutes les souches dont la virulence implique une manifestation de symptômes entériques. Ainsi, les souches entérotoxigènes (ETEC pour *enterotoxinogenic E. coli*) provoquent la diarrhée des voyageurs et la diarrhée porcine. Les souches entéro-agrégatives (EAEC) causent la diarrhée persistante. Les souches entéropathogènes (EPEC) causent la diarrhée aqueuse chez les enfants ainsi que chez les animaux. Les souches entéro-invasives (EIEC) causent la dysenterie et les infections intestinales avec des lésions invasives de la paroi, ces souches sont proches de *Shigella*. Les REPEC déjà citées sont aussi à classer dans les souches entériques. Enfin, les souches entérohémorragiques (EHEC) sont responsables de la colite hémorragique et du syndrome hémolytique urémique et comportent un stade rénal d'infection.

Parmi les souches extra-intestinales nous retrouvons les souches uropathogènes (UPEC) responsables des infections du tractus urinaire chez les humains, les chats et les chiens, ainsi que les souches responsables de la méningite néonatale chez l'humain et les souches causant la septicémie chez l'humain et l'animal, enfin les APEC déjà citées, appartiennent aussi aux souches extra-intestinales. [75]

II f Importance du transfert horizontal dans l'évolution de la virulence :

Étant donné que la taille des génomes des souches d'*E. coli* est variable, les génomes les plus grands ayant environ 1 Mb d'information génétique de plus que les génomes les plus petits, on suppose que la différence de taille est avant tout due à l'acquisition de l'ADN étranger par le biais de transfert horizontal ou à la perte de séquences génétiques par recombinaison. [70]

Les génomes les plus grands appartiennent aux souches pathogènes d'*E. coli*, dont la survie nécessite une adaptation aux niches spécifiques. Néanmoins, même chez les souches commensales K-12 on estime qu'environ 17% du génome provient de transfert horizontal entre les souches ou les espèces différentes. [74]

Les séquences acquises par transfert horizontal présentent fréquemment des caractéristiques qui permettent de les distinguer du reste du génome. C'est en particulier le cas des larges régions d'ADN présentes dans le génome des souches pathogènes, mais absentes des souches commensales, qui portent des gènes codant pour les facteurs de virulence et sont nommées îlots de pathogénicité (PAI pour *pathogenicity associated island*). [76]

II g Îlots de pathogénicité :

Les caractéristiques spécifiques des îlots de pathogénicité, les plus fréquemment observées, sont la différence en contenu G+C de ces régions par rapport au contenu moyen du reste du génome,

l'association fréquente de ces régions avec des *loci* ARN-t et la présence fréquente dans leur voisinage immédiat des phages tempérés et pseudophages, ainsi que des séquences d'intégration telles que IS1, complètes ou partielles. Les PAI portent souvent les gènes des divers facteurs de virulence, par exemple le PAI-6 de CFT073 porte les gènes *hly* et *pap* codant respectivement pour une hémolysine et une adhésine. [71] La taille des PAI peut être très différente, chez les souches virulentes d'*E. coli* elle oscille entre environ 20 kb et plus de 170 kb. Les PAI sont parfois des régions instables et mosaïques qui peuvent subir des réarrangements importants. [76] Outre les PAI les facteurs de pathogénicité peuvent aussi être situés sur des plasmides de virulence. [74]

II h Plasmides de virulence :

Les plasmides de virulence sont des éléments importants pour la pathogénicité d'une souche virulente d'*E. coli*. En effet, ces plasmides peuvent porter des facteurs de virulence, plus ou moins nombreux en fonction de leur taille, de même que des cassettes contenant des gènes de résistance aux antibiotiques. Ainsi dans le cas de la souche APEC χ 7122, on constate la présence de trois plasmides pAPEC-1, 2 et 3, dont la taille varie d'environ 70 kb pour pAPEC-3 à plus de 200 kb pour pAPEC-1. Ces plasmides sont, entre autre, responsables de la capacité de cette souche à produire et utiliser le sidérophore aérobactine (pAPEC-1), de même que d'utiliser et transformer l'entérobactine en salmochéline grâce au locus *iro* (pAPEC-1), produire l'autotransporteur Tsh responsable de l'hémagglutination thermosensible des érythrocytes de poulet (pAPEC-1), acquérir le manganèse et le fer par le biais du transporteur Sit encodé par l'opéron *sitABCD* (pAPEC-1), produire la colicine-V et résister à la streptomycine (pAPEC-2). [77-79]

De plus, les plasmides de virulence contiennent fréquemment des séquences répétitives, qui comme les séquences d'insertion (IS) peuvent permettre la recombinaison menant à l'insertion d'une partie ou de la totalité du plasmide dans le chromosome. Cette incorporation de séquences plasmidiques dans le chromosome est vue en tant que voie additionnelle d'aboutir à des îlots de pathogénicité. [80] Enfin, certains de ces plasmides sont conjugatifs ou mobilisables, ce qui permet le transfert de facteurs de virulence et des gènes de résistance aux antibiotiques d'une souche à une autre et mène à la diffusion de ces déterminants génétiques au sein de la population d'*E. coli*. [74]

II i Les divers types de facteurs de virulence :

Lors d'un processus infectieux, les pathogènes doivent pouvoir pénétrer l'organisme hôte, s'y établir de façon durable en échappant aux mécanismes de défense de l'hôte et s'y reproduire. [81] [67] Cette succession d'étapes menant à une infection, correspond à la transmission suivie par l'adhérence

et la colonisation, puis parfois par l'invasion des tissus de l'hôte et enfin par le développement et la multiplication de l'agent pathogène. [67] Il est évident qu'un agent pathogène doit posséder les gènes encodant les facteurs de virulence et de résistance aux conditions environnementales, nécessaires pour compléter les étapes décrites. Ainsi, les facteurs qui permettront au pathogène de survivre dans le milieu externe faciliteront sa transmission à un hôte susceptible. Les adhésines en permettant l'adhérence du pathogène aux cellules ou à la matrice extracellulaire de l'hôte, rendront plus facile la colonisation subséquente. De plus, les senseurs renseigneront le pathogène sur les conditions du milieu interne de l'hôte et permettront d'adapter l'expression de ses gènes aux diverses étapes de l'infection et divers sites anatomiques ou environnements cellulaires traversés dans le courant de celle-ci. Les toxines quant à elles pourront mener à l'apparition de lésions qui faciliteront l'invasion tissulaire, la résistance contre les cellules immunitaires et l'accroissement de la disponibilité des nutriments provenant des cellules de l'hôte au profit du pathogène. Enfin, les récepteurs et transporteurs appropriés seront nécessaires à l'acquisition des nutriments nécessaires à la survie et multiplication du pathogène lors des différentes étapes du processus infectieux. [81] L'ensemble des facteurs de virulence est coordonné par un réseau de régulateurs actifs en *trans* et d'éléments génétiques intervenant en *cis* sur l'expression des gènes des déterminants de virulence. [81-84] Nous proposons une représentation schématique d'une cellule d'*E. coli* appartenant à une souche virulente dans la figure 3.

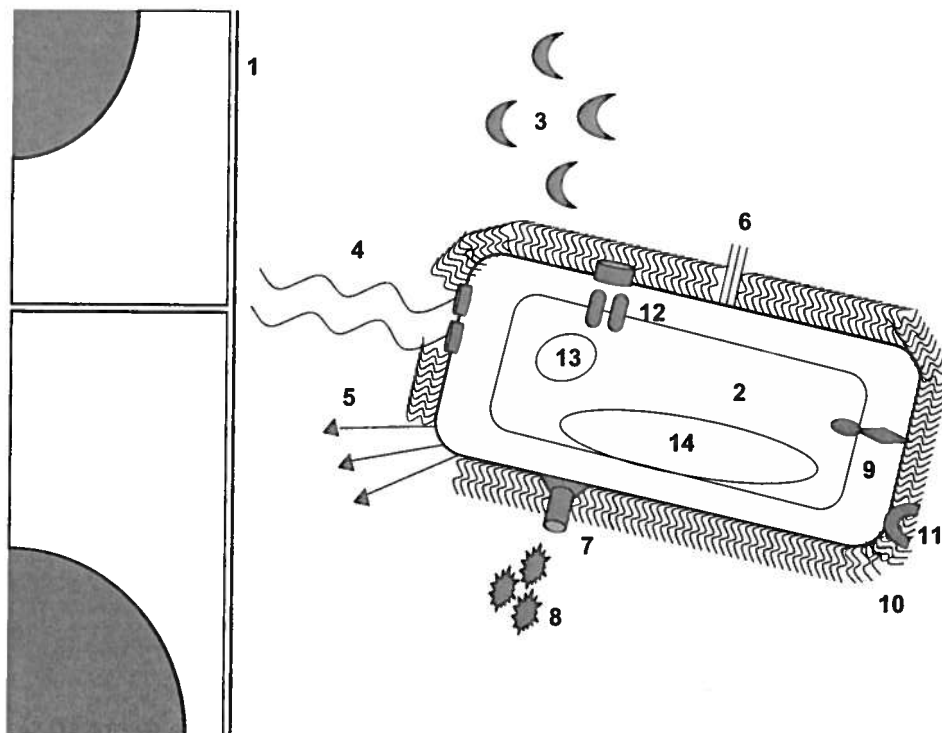


Fig. 3 : Représentation schématique d'une cellule d'une souche virulente d'*E. coli*. (1) Cellules de l'hôte, (2) Cellule d'*E. coli* (cytoplasme). (3) Sidérophores pathospécifiques (Aérobactine, Salmochelines ou Yersiniabactine). (4) Flagelles. (5 et 6) Adhésines (pili et fimbriae). (7) Système de transport pathospécifique (Exp. Système de transport de type 3). (8) Toxines. (9) Senseur. (10) Capsule et LPS. (11) Récepteur pathospécifique (12) Transporteur pathospécifique (Exp. SitABCD). (13) Plasmide de virulence. (14) Chromosome bactérien

II j Les facteurs de virulence chez *E. coli* :

Durant l'évolution, les souches pathogènes d'*E. coli* ont acquis de nombreux déterminants de pathogénicité. Des facteurs de virulence intervenant à toutes les étapes du processus infectieux, de même que dans différents types d'infection, peuvent être décrits chez les diverses souches d'*E. coli*. Ainsi, *E. coli* est capable de produire différents types d'adhésines, par exemple les pili P, les pili de type I, les pili S, les curli, etc. [85] De nombreux senseurs permettent à *E. coli* de s'adapter à son environnement. Un exemple de ces senseurs est le système à deux composantes PhoB/R permettant de s'adapter à la variation de la concentration en phosphate inorganique extracellulaire et d'en contrôler le transport. [86]

La liste non exhaustive des divers stimuli environnementaux influençant l'expression des facteurs de virulence comprend : la baisse de la quantité de fer, stress oxydatif, changement de sources de carbone, variation de la composition et de la concentration des acides aminés, variation du pH, variation de la température, variation de l'osmolarité du milieu extracellulaire, etc. [81]

En ce qui concerne la production des toxines par *E. coli*, celle-ci varie d'un group de souches à un autre, mais aussi en fonction des sites anatomiques et de l'environnement cellulaire des bactéries. En plus du lipopolysaccharide commun aux entérobactéries, les toxines produites par les diverses souches d'*E. coli* sont : les toxines thermolabiles, les toxines thermostables, les shigatoxines, les α -hémolysines, le facteur cytotoxique nécrosant (CNF) et les toxines cytolétales distendantes. De plus, certains groupes d'*E. coli* produisent des toxines particulières : les entérohémolysines des EHEC, les entérotoxines et les cytotoxines des EIEC, les toxines stables des EAEC (les *E. coli* entéro-agrégatives). Pour certaines de ces toxines le mode de fonctionnement est défini expérimentalement, pour d'autres il est déduit par l'association des souches productrices des toxines avec des pathologies spécifiques. Le mode d'action de ces toxines peut-être subdivisé en plusieurs groupes suivants : facilitant l'invasion tissulaire, lysant les cellules de l'hôte (α -hémolysine), bloquant la synthèse protéique (shigatoxines), modulant les activités cellulaires normales (toxines thermolabiles). La finalité de toutes les toxines est d'atteindre le site anatomique de prédilection et d'adapter l'environnement cellulaire de ce site pour les besoins du pathogène. [81]

La protection d'*E. coli* contre les défenses de l'hôte implique plusieurs mécanismes, dont l'élaboration de la capsule, la présence de certains types de LPS et la protection contre l'effet toxique des radicaux libres d'oxygène et d'azote. Les facteurs de virulence liés à ce mécanismes sont surtout importants chez les souches extra-intestinales d'*E. coli* (ExPEC). En effet, lors des infections dans certains sites anatomiques; reins et méninges chez l'humain, sacs aériens ainsi que la rate et le foie chez les oiseaux ou encore circulation sanguine lors de la septicémie, ces souches sont directement en contact avec les cellules immunitaires et le système du complément. D'ou la nécessité d'éviter la phagocytose et l'opsonisation par le complément ainsi que le stress oxydatif généré par les cellules immunitaires tels que les neutrophiles humains. [48]

Il faut noter que les antigènes de surface des cellules d'*E. coli* sont hautement polymorphiques (on compte pas moins de 160 antigènes-O somatiques, 80 antigènes capsulaires K et 60 antigènes flagellaires-H). [81] En ce qui concerne la capsule qui sert de protection contre le complément ainsi qu'à l'évasion de la phagocytose, il semblerait que seuls les types capsulaires appartenant au groupe II tels que K1, K2, K3, K5, K12 et K13 soient associés à des infections extra-intestinales. En particulier, les capsules K1 et K5 composées d'acide polysialique sont les plus fréquemment associées avec les souches extra-intestinales. [87] Ces capsules mimeraient l'acide sialique qui est un des constituants majeurs de la couche des polysaccharides recouvrant les cellules des mammifères. Ce mimétisme rendrait la cellule bactérienne moins susceptible de subir l'action du complément et la phagocytose. [81]

Certains types de LPS comportant des antigènes O spécifiques (O-acétyles) ont aussi été associés avec des infections ExPEC, par exemple les souches les plus virulentes d'APEC appartiennent aux classes O-1, O-2 et O-78 des antigènes-O. [88]

Quant aux défenses contre le stress oxydatif, elles comprennent les enzymes tels que la catalase, la peroxydase, la superoxyde-dismutase et la superoxyde-réductase, de même que les récepteurs et les systèmes de transport pour leurs cofacteurs métalliques respectifs. Ces systèmes sont nécessaires non seulement lors du processus infectieux mais aussi lors de la croissance aérobie d'*E. coli*. [89] Il est à noter que le stress oxydatif est intimement lié à l'homéostasie des métaux, en particulier du fer. [90] Le manganèse et le zinc sont aussi des cofacteurs importants des métallo-enzymes de détoxification des dérivés radicaux d'oxygène. [91, 92] La perte de la fonction de ces métallo-enzymes a des conséquences néfastes pour la survie cellulaire. [93, 94] Bien que ces métallo-enzymes ne soient pas des facteurs de virulence à proprement parler, la présence de certaines d'entre-elles est un atout important pour la survie des bactéries pathogènes *in vivo*. [95] Les transporteurs qui permettent l'import des cofacteurs métalliques de ces métallo-enzymes sont aussi très importants *in vivo*. [20]

Certains des transporteurs qui font partie de notre étude sont impliqués dans la résistance au stress oxydatif, nous y reviendrons dans les chapitres correspondants.

Enfin, nombreux sont les récepteurs et transporteurs divers de la membrane externe, du périplasme et de la membrane cytoplasmique pouvant contribuer à la virulence d'*E. coli*. Leur utilisation ne se limite pas aux processus infectieux mais déborde largement le cadre de la pathogénicité. En effet, le rôle global de tous ces systèmes étant de pourvoir les cellules bactériennes en nutriments et éléments inorganiques indispensables, il apparaît évident qu'ils sont importants autant à l'intérieur qu'à l'extérieur de l'organisme hôte. La description de tous ces systèmes dépasse largement le cadre de notre document. Néanmoins, étant donné qu'en leur absence le processus infectieux est voué à l'échec, nous avons considéré important de les citer parmi les systèmes pouvant contribuer à la virulence. [81] Parmi les systèmes orientés vers l'acquisition des nutriments et des éléments inorganiques indispensables à la survie bactérienne et au succès d'un processus infectieux il y a évidemment les transporteurs de métaux. La capacité d'acquérir les ions métalliques nécessaires et de se débarrasser des ions métalliques nuisibles est une des conditions de la survie de tout type de cellule. En effet, l'état et la composition du métallome cellulaire affectent tous les processus cellulaires. [6]

Nous allons donc, dans les pages qui suivent, nous pencher d'une façon détaillée sur la capture et le transport des ions métalliques, plus particulièrement sur celui de fer, de manganèse et de zinc. Bien que l'acquisition de ces métaux soit également importante dans l'environnement, dans l'hôte ces systèmes sont indispensables et ont une implication profonde dans la virulence. En effet, les métaux de transition se retrouvent à l'interface de la compétition entre l'hôte et les bactéries pathogènes.

III Le zinc

III a Caractéristiques physico-chimiques du zinc :

Le zinc (Zn), dont le numéro atomique est 30 et la masse atomique de 65,4 Da, appartient à la série chimique des métaux de transition, est classifié en tant qu'élément du groupe 12, de la période 4 et du bloc d du tableau périodique des éléments. Le rayon atomique de Zn est de 134 pm. Sa structure électronique contient une couche 3*d* remplie et 2 électrons appartenant à la couche 4*s* externe. Les deux électrons *s* peuvent être facilement perdus pour aboutir à une structure électronique plus stable. L'unique état d'oxydation de Zn est donc II et il ne subit pas de modification en fonction du potentiel Redox de l'environnement. À cause de sa structure électronique, Zn²⁺ a une géométrie de coordination impliquant quatre à six ligands avec une préférence pour des liaisons tétraédriques. De plus, Zn²⁺ est aussi un acide de Lewis intermédiaire du point de vue de la gradation acide mou > acide dur, ce qui lui permet d'interagir autant avec les bases de Lewis molles que les bases de Lewis dures. Ces propriétés physico-chimiques permettent au Zn²⁺ de s'associer avec un large ensemble de ligands cellulaires et de jouer un rôle catalytique et structurel de premier plan dans les protéines des procaryotes et eucaryotes. [96, 97]

III b Le zinc dans la biologie:

Le zinc est un micronutriment essentiel pour l'ensemble des formes de vie, autant eucaryotes (monocellulaires ou pluricellulaires) que procaryotes. Une étude bioinformatique récente ayant analysé cinquante-sept protéomes à travers les trois domaines du vivant (bactéries, archéobactéries et eucaryotes), ne fait pas état d'organisme dépourvu de métalloprotéines Zn²⁺-dépendantes putatives. Chez les organismes examinés lors de cette étude, la proportion des métalloprotéines Zn-dépendantes variait entre quatre et dix pour cent du protéome cellulaire total, la proportion étant plus élevée chez les eucaryotes.[98]

Selon Williams, Zn²⁺ est un des métaux les mieux adaptés à l'interaction avec les métalloprotéines. [6] En effet, les caractéristiques physicochimiques du Zn lui permettent de s'adapter à de nombreux sites d'association protéine-métal et d'être lié par un certain nombre de motifs dans lesquels il s'associera à l'azote, l'oxygène ou le soufre des acides aminés avec une affinité élevée. [99] On distingue plusieurs types de sites d'association du Zn²⁺ aux métalloprotéines : sites catalytiques, sites co-catalytiques, sites structuraux et sites d'interface protéique. Dans les sites catalytiques, Zn²⁺ est le plus souvent lié par trois histidines et est toujours associé à une molécule d'eau qui forme la quatrième liaison du tétraèdre. Dans les sites structuraux, Zn²⁺ est surtout lié par quatre cystéines. Les sites co-catalytiques contiennent deux ou trois autres ions métalliques associés au Zn²⁺, parfois en présence d'une molécule d'H₂O, ce type de site ne contient jamais de cystéines, mais plutôt des

histidines, glutamines ou de l'acide aspartique. Enfin, les sites d'interface protéique interviennent dans la structure quaternaire des protéines. Dans ce cas, les acides aminés qui serviront de ligands au Zn^{2+} , sont fournis par deux protéines ou deux domaines protéiques différents. [34] Lors de la catalyse enzymatique, Zn^{2+} sert surtout à stabiliser les charges électro négatives produites lors de la réaction. En particulier lors de l'hydrolyse, Zn^{2+} permet de stabiliser la polarisation des molécules du solvant (d'eau) qui serviront par la suite à lyser le substrat. [100] Par contre, dans son rôle structural, le zinc sera isolé du solvant par son environnement protéique, son environnement sera donc composé de résidus hydrophobes. Il est à noter que c'est la métalloprotéine au complet, et non seulement le site de liaison au métal, qui détermine comment les caractéristiques physicochimiques du Zn^{2+} seront utilisées pour accomplir son rôle catalytique ou structural. [97]

Lié au sein d'un site catalytique en tant que cofacteur enzymatique, Zn^{2+} est le seul métal qui se retrouve dans les enzymes des 6 classes fonctionnelles définies par l'IUPAC (les classes fonctionnelles étant ; les oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases). [97] Il participe ainsi au métabolisme cellulaire des sucres, protéines, lipides et acides nucléiques. [101] en tant que cofacteur enzymatique de l'ADN polymérase et de l'ARN polymérase, le zinc intervient dans la réplication et la transcription du message génétique. [102, 103] en tant qu'élément structural des protéines ribosomales, le zinc intervient dans la traduction du message génétique en peptides. [104, 105] en tant qu'élément structural des régulateurs transcriptionnels, le zinc permet le contrôle de l'expression génétique. [106]

Étant donné l'importance ubiquitaire du Zn^{2+} , autant pour la physiologie cellulaire eucaryote que procaryote, il est vraisemblable que des modifications de l'homéostasie du zinc, interviennent chez les cellules de l'hôte et les bactéries infectieuses lors des interactions hôte pathogène. [44]

III c Le zinc chez l'hôte:

Zn^{2+} joue une panoplie de rôles dans la biologie des organismes supérieurs. En effet, Zn^{2+} est directement impliqué dans le repliement et l'activité d'environ 10% des protéines des mammifères et module la fonction d'un nombre encore plus élevé de celles-ci. [107, 108] La classe la plus importante des protéines Zn^{2+} -dépendantes est celle des régulateurs transcriptionnels. [108] L'action du Zn^{2+} sur l'organisme des mammifères est donc pléiotropique. Par exemple, chez l'homme, des études récentes impliquent le zinc dans la reproduction (surtout chez les mâles), le fonctionnement du système nerveux, le fonctionnement de certaines hormones, les processus de vieillissement et surtout dans le fonctionnement du système immunitaire et la réponse immunitaire à l'infection autant bactérienne que virale. [109-114]

III d Transporteurs eucaryotes du zinc:

Le transport du zinc chez les eucaryotes a surtout été étudié dans deux modèles distincts : celui de la levure (*S. cerevisiae*) et celui de la souris. [115, 116] Bien qu'un rôle de la transferrine dans le transport du Zn^{2+} au niveau de la paroi intestinale ait été suggéré, pour environ 70% du zinc plasmatique c'est l'albumine qui est le ligand principal, leur liaison étant affectée par la concentration plasmatique d'acides gras et d'autres molécules. [117-119] Le transport du Zn^{2+} du plasma vers l'endothélium vasculaire, est aussi au moins partiellement dû à une endocytose dépendante de l'albumine. [120, 121] Environ 20% du zinc plasmatique est aussi fortement lié à l' α_2 -macroglobuline, mais l'importance de cette forme du zinc plasmatique est imparfaitement comprise. [122]

Deux familles de transporteurs de Zn^{2+} , appartenant au groupe des transporteurs liés au soluté ou SLC (pour *Solute-Linked-Carrier*), sont importantes pour l'import et l'export cellulaires du Zn^{2+} . Il s'agit des familles Znt (*Zn transporter*) et Zip (pour *ZRT-IRT like proteins*) aussi nommées SLC30 et SLC39. [123] Le mécanisme de transport exact de ces transporteurs n'est pas connu actuellement, bien qu'il a été démontré qu'il est indépendant de l'ATP. Il est à noter que ces deux familles de transporteurs de Zn^{2+} qui comprennent 100 protéines pour SLC30/Znt et 86 pour SLC39/Zip, sont aussi présentes chez d'autres organismes, dont de nombreuses bactéries. [21] Il est aussi à souligner que le transport des ions métalliques autres que Zn^{2+} a été démontré pour certains de ces transporteurs. [124-128]

Les rôles des deux familles des transporteurs semblent opposés, alors que les transporteurs Zip/SLC39 importent Zn^{2+} vers le cytoplasme à partir du milieu extracellulaire ou des vacuoles cytoplasmiques, les transporteurs Znt/SLC30 (qui appartiennent à un sous-groupe des transporteurs SLC : les transporteurs CDF pour *Cation-Diffusion Facilitator*) exportent Zn^{2+} du cytoplasme vers les vacuoles de stockage ou vers le milieu externe. [116] On dénombre chez l'humain 9 transporteurs Znt et 15 transporteurs Zip différents qui sont exprimés de façon différente selon les tissus et les types cellulaires. Chez l'humain 14 de ces transporteurs ont été impliqués dans l'influx ou l'efflux cellulaire du Zn^{2+} . [123]

Parmi les transporteurs Zip/SLC39, Zip1 (SLC39A1), Zip2 (SLC39A2) et Zip4 (SLC39A4) ont été impliqués dans l'import du Zn^{2+} à travers la membrane cellulaire, Zip1 et Zip4 étant importants pour le transport intestinal du Zn^{2+} . [128] La déficience congénitale en Zip4 (Zip4) est la cause d'un déficit en Zn^{2+} qui se manifeste par un syndrome connu en tant que acrodermatite entéropathique. [129] Lors de l'infection, le transporteur Zip14 a été impliqué dans l'hypo-zincémie concomitante à la phase aiguë de l'inflammation. Stimulé par l'interleukine 6, ce transporteur est exprimé au niveau du foie et

permet le stockage du Zn^{2+} plasmatique dans cet organe, en favorisant ainsi un abaissement marqué de la disponibilité du Zn^{2+} dans le plasma. [44]

Parmi les transporteurs Znt/SLC30 humains, Znt1 permet aux cellules des mammifères de résister à la toxicité du Zn^{2+} en favorisant l'efflux des ions de ce métal. [130] Les transporteurs Znt2, 5, 6 et 7 permettent d'accumuler le Zn^{2+} dans des vésicules intracellulaires en détoxifiant ainsi le cytoplasme. [123]

III e Homéostasie eucaryote du zinc:

Indépendamment de leur type, l'expression des transporteurs eucaryotes de Zn^{2+} est contrôlée au niveau transcriptionnel par MTF-1 (pour *Metal-responsive-element-binding Transcription Factor-1*) qui répond aux changements dans l'homéostasie du Zn^{2+} et aussi à d'autres signaux biologiques tels que le stress oxydatif. [131, 132] MTF-1 se fixe au niveau de l'élément de réponse aux métaux, une séquence palindromique présente dans le promoteur des gènes cibles. [133, 134] MTF-1 contrôle aussi les métallothionéines, qui sont les chélateurs intracellulaires de Zn^{2+} et d'autres métaux de transition et qui sont aussi importantes dans la résistance au stress oxydatif. [132, 135]

Le stress oxydatif est directement relié à l'inflammation et à l'action du système immunitaire. [51] Le fait que le transport du zinc soit régulé en fonction du stress oxydatif confirme le lien existant entre l'homéostasie du zinc et l'immunité. [109, 136]

III f Zinc et l'immunité:

Comme nous l'avons mentionné précédemment, la phase aiguë de la réponse immunitaire à une infection, s'accompagne d'une baisse marquée du Zn^{2+} plasmatique (hypozincémie). L'explication couramment avancée de cet aspect de la phase aiguë de la réponse immunitaire, est qu'il est nécessaire de limiter au maximum la quantité des ions métalliques indispensables (tels que le Zn^{2+}) à laquelle le pathogène pourrait avoir accès, tout en réservant ces ions à l'usage de l'organisme hôte qui doit se défendre contre l'infection. Cette baisse est surtout due à une redistribution tissulaire du Zn^{2+} , dont une des caractéristiques est le stockage du Zn^{2+} dans le foie. Ce stockage s'opère grâce à l'accroissement de l'expression du transporteur Zip14 au niveau de la membrane plasmatique des hépatocytes permettant le passage du Zn^{2+} plasmatique dans les hépatocytes. L'entrée du Zn^{2+} s'accompagne d'une induction des métallothionéines. L'accroissement de l'expression du Zip14 est contrôlé par IL-6 et semble être confiné au foie. [44]

L'interaction entre IL-6 et l'homéostasie du zinc s'étend aussi à d'autres aspects du système immunitaire. IL-6 et le Zn^{2+} sont importants pour la capacité d'adaptation du système immunitaire

(plasticité immunitaire). Ainsi, l'activité des cellules NK et l'équilibre entre les fonctions Th2 et Th1 des lymphocytes semblent aussi être dépendants du taux du Zn^{2+} plasmatique et du taux d'IL-6. De plus, l'activité de la hormone thymique est liée au taux du zinc plasmatique. [113, 136, 137]

L'homéostasie du Zn^{2+} intracellulaire est aussi importante pour l'activité des cellules immunitaires. [109] Ainsi, chez les cellules dendritiques, l'activation du récepteur TLR 4 (*Toll-like receptor 4*) par le LPS, influence le taux de Zn^{2+} intracellulaire, ce qui à son tour affecte l'expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité II (CMH II). [138] D'autre part, chez les monocytes, le taux de Zn^{2+} disponible affecte plusieurs sentiers de signalisation qui influencent la fonction des récepteurs Toll, ayant ainsi un impact direct sur la reconnaissance des structures immunogènes des pathogènes par les cellules de l'immunité innée et sur la synthèse des interleukines. [112]

La relation du Zn^{2+} avec l'immunité et l'inflammation ne doit pas être dissociée de la relation existante entre l'homéostasie du Zn^{2+} et le stress oxydatif. [111] En effet, la régulation du transport du Zn^{2+} par le régulateur transcriptionnel MTF-1 est directement affectée par le stress oxydatif. [131] Par conséquent le stress oxydatif affecte directement le taux du Zn^{2+} intracellulaire. [139] D'autre part, l'augmentation du Zn^{2+} intracellulaire et l'induction des métallothionéines ont des effets bénéfiques sur la survie des cellules soumises au stress oxydatif. [140] De plus, un taux plasmatique et cellulaire insuffisant de Zn^{2+} est un facteur aggravant dans des situations de stress oxydatif, probablement parce que le stress oxydatif affecte le fonctionnement des facteurs transcriptionnels Zn^{2+} -dépendants et d'autres molécules importantes pour la survie cellulaire. [141, 142] Enfin, un taux approprié de Zn^{2+} plasmatique peut être important pour la protection de l'intégrité des membranes cellulaires soumises à un stress oxydatif. [143]

L'importance lors de l'inflammation, des taux de Zn^{2+} plasmatique et intracellulaire pour une protection efficace contre les effets du stress oxydatif généré par les cellules immunitaires, permet probablement d'expliquer des observations récentes qui suggèrent qu'une hypozincémie prolongée est un facteur aggravant la mortalité dans le cas du choc septique. Ces observations, tout en confirmant l'importance du Zn^{2+} dans le cadre d'une réponse immunitaire systémique, indiquent que l'expression de certaines formes de la métallothionéine provoque une baisse prolongée du taux plasmatique de Zn^{2+} . Cette hypozincémie sévère, qui dépasse la durée de la phase aiguë de l'inflammation, s'accompagne d'une mortalité plus élevée chez les patients ayant contracté une septicémie. Cette mortalité s'explique par un choc septique plus sévère avec un stress oxydatif très important. [144, 145]

Il est donc probable qu'après une première phase inflammatoire aiguë, lors de laquelle l'organisme hôte se doit de limiter le Zn^{2+} plasmatique afin de le soustraire aux pathogènes, une

seconde phase soit indispensable, pendant laquelle le Zn^{2+} plasmatique doit devenir plus accessible pour permettre aux cellules de l'hôte de survivre au stress oxydatif. C'est cette double contrainte, entre la nécessité de limiter l'accès des pathogènes au Zn^{2+} (et les autres ions métalliques indispensables) et la nécessité de rendre le Zn^{2+} (ainsi que d'autres ions métalliques nécessaires) accessible pour les cellules de l'hôte qui est probablement à l'origine de l'utilisation par les cellules immunitaires des chélateurs protéiques inhibant la croissance bactérienne. Ainsi, le calprotectin est un chélateur protéique de Zn^{2+}/Mn^{2+} excrété par les neutrophiles et inhibant la croissance bactérienne. [45]

Des protéines bactéricides Zn^{2+} -dépendantes de reconnaissance du peptidoglycan, ont aussi été récemment identifiées en tant qu'élément sécrétoire de la défense immunitaire innée. Ces protéines, nommées PGRPs (*Peptidoglycan Recognising Proteins*), ont une activité d'amidase dépendante d'un domaine similaire à certaines protéines bactériennes ou bactériophagiques. Ce domaine leur permet de se fixer au peptidoglycan et de le lyser, en exerçant ainsi leurs propriétés bactériostatiques. [146, 147]

III g Le zinc chez les bactéries :

Comme nous l'avons mentionné précédemment, le zinc a une haute importance autant pour les procaryotes que les eucaryotes. Chez *E. coli* K-12 les métalloprotéines Zn^{2+} -dépendantes putatives seraient au nombre de 228 et les gènes qui les encodent comptent pour environ 5 % du génome. Les métalloprotéines Zn^{2+} -dépendantes jouent des rôles divers et essentiels dans la physiologie bactérienne. Les fonctions Zn^{2+} -dépendantes des procaryotes sont souvent similaires à celles des eucaryotes et dans les deux cas le zinc est très important pour de nombreux aspects du métabolisme cellulaire. Par contre, la régulation transcriptionnelle est moins Zn^{2+} -dépendante chez les bactéries que chez les eucaryotes. C'est d'ailleurs la principale cause du nombre plus bas des métalloprotéines Zn^{2+} -dépendantes chez les procaryotes. De plus, les cellules eucaryotes ont des compartiments cellulaires et des organelles que les procaryotes n'ont pas. Par conséquent, la distribution du zinc dans les compartiments cellulaires particuliers, grâce à des transporteurs spécifiques, est présente chez les eucaryotes mais absente chez les procaryotes. [98] Étant donné que les bactéries sont des microorganismes unicellulaires qui sont en contact direct avec leur environnement, dont ils ne sont séparés que par un ensemble de membranes, l'homéostasie du Zn^{2+} se réduit chez elles à un contrôle strict de l'import et de l'efflux, ainsi qu'à un stockage du Zn^{2+} sous la forme de métalloprotéines. [148]

En général, chez les cellules procaryotes la concentration cellulaire du zinc est la deuxième en importance après celle du fer. La cellule d'*E. coli* contient en moyenne 200 000 ions Zn^{2+} . Mais malgré l'importance totale du bassin de Zn^{2+} cellulaire, il est fort probable qu'aucun de ces ions ne se trouve à l'état libre dans le cytoplasme. [22] Un excès de sites de liaison des ions Zn^{2+} est important

pour la physiologie cellulaire, car en son absence le Zn^{2+} excédentaire pourrait exercer sa toxicité en se liant aux sites de liaison des autres métaux indispensables pour la fonction des différentes métallo-enzymes. [6] L'entreposage cellulaire des ions de Zn^{2+} se fait surtout dans les métalloprotéines ribosomales. [104, 149] Les bactéries contiennent aussi des métallothionéines qui sont distinctes de leurs homologues eucaryotes et sont beaucoup moins bien caractérisées. Par exemple, chez *E. coli*, aucune donnée expérimentale ne confirme l'importance de l'homologue de SmtA pour le stockage du Zn^{2+} . [150-152] Enfin, de même que chez les eucaryotes, les ions Zn^{2+} sont également contenus dans les cellules bactériennes et sont fréquemment associés aux métallo-enzymes en tant que cofacteurs enzymatiques ou liés à d'autres métalloprotéines cytoplasmiques en tant qu'élément structural. [105, 153]

III h L'homéostasie bactérienne du zinc :

Des efforts ont été entrepris afin de mieux comprendre l'impact que pouvaient avoir les perturbations de l'homéostasie du Zn^{2+} sur la physiologie des cellules bactériennes. Des études ont montré que les variations de la disponibilité en Zn^{2+} extracellulaire entraînaient des changements au niveau du transcriptome et du protéome cellulaires. Ces changements dépendaient de la concentration du Zn^{2+} extracellulaire et étaient aussi fonction du temps d'exposition cellulaire à des concentrations insuffisantes ou excessives de Zn^{2+} . On assistait donc à un phénomène d'adaptation cellulaire à des concentrations non physiologiques de Zn^{2+} . Ces études sont particulièrement intéressantes car elles démontrent l'étendue des fonctions cellulaires affectées par le manque ou l'excès d'un métal. C'est pour cela que nous avons choisi d'analyser ces études de façon détaillée afin de faire des recoupements de fonction qui pourraient nous guider dans notre étude sur l'importance du transport du zinc lors du processus infectieux causé par les souches ExPEC. Un résumé succinct de ces fonctions est présenté dans le tableau 1. La description détaillée des gènes et fonctions cellulaires affectés par l'homéostasie du zinc, sont présentés dans les pages qui suivent ce tableau.

Tab.1 : Fonctions cellulaires affectées par les variations de l'homéostasie du zinc :

Manque de zinc [154]

Fonctions induites

Import du zinc (*znu*)
Protéine ribosomale indépendante du zinc

Défenses contre le stress oxydatif
Gènes Fur-dépendants impliqués dans le métabolisme du fer.

Fonctions réprimées

Protéines ribosomale zinc-dépendantes
Métabolisme des sucres
Synthèse des flagelles

Excès de zinc [155-159]

Fonctions induites

Efflux du zinc (*zntA*)
Protéines ribosomales zinc dépendantes
Synthèse des flagelles

Défenses contre le stress périplasmique et de membrane
Modifications de la membrane externe
Biosynthèse de la cystéine

Fonctions réprimées

Import du zinc (*znu*)

Synthèse des curli
Défenses contre le stress oxydatif

Transport et biosynthèse de certains acides aminés et peptides

Réponses transcriptionnelles concordantes à l'excès et au manque de zinc

Influx du zinc induit lors du manque et réprimé lors de l'excès. Efflux du zinc induit lors de l'excès
Flagelles réprimés lors du manque de zinc et induits lors de l'excès. Curli inhibés lors de l'excès
Défenses contre le stress oxydatif induits lors du manque. Gènes réprimés par Fur induits lors du manque de zinc. Défenses contre le stress oxydatif réprimées lors de l'excès de zinc.

Quand le Zn^{2+} est en quantité insuffisante pour le fonctionnement cellulaire optimal, la cellule tente de s'adapter en activant l'entrée du Zn^{2+} dans le cytoplasme et en diminuant son utilisation. Lors d'une étude transcriptionnelle menée par le groupe de Crowder, l'utilisation du chélateur N,N,N',N'-tetrakis (2-pyridylmethyl) ethylenediamine (TPEN) durant la croissance en milieu minimal, a provoqué une baisse du Zn^{2+} extra et intracellulaire et a entraîné des modifications dans le transcriptome d'*Escherichia coli* avec une augmentation significative de la transcription de 55 transcrits et une baisse significative de la transcription de 46 transcrits. [157]

Comme on pouvait s'y attendre, la transcription des gènes directement régulés par le taux de Zn^{2+} a été affectée, c'était en particulier le cas pour les gènes *znuA* et *znuC* codant pour les protéines du transporteur de haute affinité ZnuABC, responsable de l'import du Zn^{2+} et dont l'expression a été augmentée. C'était aussi le cas du gène *yodA*, codant pour une protéine qui est fusionnée à ZnuA chez

certaines bactéries et dont le rôle exact dans l'homéostasie du zinc n'est pas encore connu. [105] Il est possible que YodA (aussi appelé ZinT) soit une chaperonne périplasmique des métaux. [160]

Mais la baisse de la disponibilité du Zn^{2+} a aussi entraîné d'autres modifications transcriptionnelles qui dépassent le cadre du transport du Zn^{2+} . Par exemple, la transcription du gène *ykgM* codant pour la protéine ribosomale indépendante du Zn^{2+} , a aussi été induite, probablement pour mobiliser le Zn^{2+} contenu dans les ribosomes qui sont le réservoir le plus important du Zn^{2+} cellulaire. [104, 105, 161] Lors de cette étude, on a aussi assisté à l'augmentation de la transcription des gènes impliqués dans le transport du fer et dans la gestion du stress oxydatif, ainsi qu'à la baisse de la transcription des gènes impliqués dans la production des flagelles et des enzymes impliquées dans le métabolisme des sucres. Bien que l'affinité du TPEN pour Zn^{2+} soit assez élevée, il n'est pas strictement spécifique. En fait, selon la base de données du NIST sur les chélateurs métalliques, l'affinité de TPEN pour Fe^{2+} est de $\log K_a=14,38$ et pour le Zn^{2+} $\log K_a=15,8$, TPEN peut donc chélater d'autres ions métalliques, dont le Fe^{2+} . Il est donc possible que l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le transport du fer et partant de là de ceux impliqués dans la gestion du stress oxydatif, soit liée à la chélation du fer par TPEN. Il est aussi possible que le manque de Zn^{2+} affecte directement la fonction de Fur, le régulateur global du métabolisme cellulaire du fer chez la majorité des bactéries, puisque ce régulateur est une métalloprotéine Zn^{2+} -dépendante. [162] Il est aussi à noter que le TPEN est un chélateur capable de diffuser à l'intérieur même de la cellule et par conséquent à y concurrencer les diverses métalloprotéines pour la liaison au Zn^{2+} . Quoi qu'il en soit, le manque du Zn^{2+} affecte clairement l'expression hôte pathogène de l'information génétique d'*E. coli* et a un impact sur son métabolisme.

D'autre part, l'excès de Zn^{2+} est toxique et les bactéries ont développé de nombreux mécanismes de résistance à cette toxicité. Plusieurs études ont abordé chez *E. coli* les changements transcriptionnels et protéomiques qu'entraîne le taux excessif de Zn^{2+} extracellulaire. Les résultats de ces études diffèrent, étant donné que des concentrations différentes de Zn^{2+} ont été employées et que les cultures analysées avaient un temps d'exposition et des niveaux d'adaptation différents au Zn^{2+} .

Dans la première de ces études par Brocklehurst et Morby, les changements transcriptionnels des souches adaptées à des concentrations élevées de Zn^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} et Ni^{2+} ont été analysés. [156] L'étude visait à déterminer les mécanismes transcriptionnels de la tolérance à la toxicité de ces métaux. Les résultats indiquent que la diminution de l'expression des porines de la membrane externe OmpA et OmpC est l'un de ces mécanismes. Un autre de ces mécanismes est l'activation de la transcription des protéines InsA et InsB des éléments d'insertion IS1. Les éléments d'insertion permettent la transposition des éléments génétiques mobiles ce qui augmente la plasticité du génome bactérien.

Cette plasticité permet probablement une adaptabilité accrue dans des conditions de stress. D'ailleurs une expression d'*insA-7* à partir d'un promoteur hétérologue a favorisé l'apparition d'une résistance accrue au Zn^{2+} .

La seconde de ces études a été menée par le groupe de R. K. Poole avec une concentration sub-toxique de Zn^{2+} , à laquelle a été adaptée une souche d'*E. coli* K-12 lors de sa croissance dans un chémostat contenant un milieu défini sans phosphate favorisant la disponibilité maximale des ions métalliques (dont Zn^{2+}). [155] Cette étude visait à définir les changements transcriptionnels affectant *E. coli* dans un milieu fortement excédentaire en Zn^{2+} . Un grand nombre de gènes différentiellement transcrits ont été identifiés. Nous allons nous attarder plus longuement sur cette étude, car les données qui y sont présentées nous paraissent de grande importance.

Parmi les gènes dont la transcription a été accrue (64 au total) on retrouve les gènes des transporteurs impliqués dans la résistance aux divers agents toxiques, dont *zntA* qui encode le transporteur assurant l'efflux de Zn^{2+} et Pb^{2+} . Les gènes du système Cus qui permet l'efflux des ions Cu^{2+} et Ag^{2+} , les gènes du système Mdt qui permet l'efflux de nombreux produits bactéricides, le gène encodant la pompe à aminoglycosides *acrD* et le gène du transporteur assurant l'efflux de l'ammonium *amtB* complètent le tableau des gènes impliqués dans l'export des produits toxiques. Ces données suggèrent qu'une forte concentration de Zn^{2+} peut favoriser l'apparition de la résistance à des antibiotiques et des produits bactéricides. En fait, tout se passe comme si la réponse à des produits bactéricides et aux métaux toxiques tels que Zn^{2+} , Pb^{2+} , Ag^{2+} et Cu^{2+} était coordonnée. Une des explications possibles est que ces produits bactéricides génèrent le même type de stress que les métaux toxiques. Il est à noter que *ompC* dont l'expression était réprimée lors de l'étude réalisée par Brocklehurst et Morby, est induite lors de la présente étude, il n'est donc pas certain que la diminution de l'expression de cette celui soit essentielle à la résistance aux métaux.

De plus, les gènes reliés à la réponse au stress de la membrane externe et du périplasma ont aussi été fortement induits. Parmi ces gènes certains faisaient partie du régulon contrôlé par le système à deux composantes CpxR/CpxA responsable de la réponse au stress de l'enveloppe externe et du périplasma. Ainsi, *cpxP* code pour une protéine d'adaptation au stress périplasmique, *spy* code pour une protéine de résistance au stress chapitres induit par les métaux et *degP* code pour une protéase qui dégrade les protéines dénaturées dans le périplasma.

D'autres gènes reliés à un stress de l'enveloppe externe sont contrôlés par un autre système à deux composantes : BasS/BasR (PmrA/PmrB) qui régule les modifications du lipide A du LPS afin de diminuer la charge négative des lipopolysaccharides de la membrane externe et rendre celle-ci plus résistante à des ions métalliques tels que Fe^{3+} et Zn^{2+} , l'acidité, les peptides antimicrobiens cationiques

et leur homologue l'antibiotique polymyxine B ou encore les sels biliaires. Les gènes dépendants de BasS/BasR induits lors de cette étude sont ceux de l'opéron *arnA-arnF* et *ais*. Ces gènes sont impliqués dans la modification du lipide A du LPS (opéron *arnA-F*) et la protection de la membrane contre l'action de l'aluminium (*ais*). Il est à souligner que la régulation BasS/BasR dépendante est reliée au système de régulation à deux composantes PhoP/PhoQ qui est impliqué avec d'autres régulateurs (BasS/BasR, RcsC/RscB, RstA/RstB, SsrB/SpiR, SlyA et EvgA/EvgS) dans un réseau complexe de régulation du transport de Mg^{2+} , résistance aux peptides cationiques, résistance à l'acidité, modifications de la membrane externe et l'expression conséquente des facteurs de virulence chez certaines espèces pathogènes bactériennes. Ce réseau de régulation est très important dans la physiologie des nombreuses espèces bactériennes Gram négatives. [163-166] Au moins deux gènes directement contrôlés par PhoP/PhoQ sont induits lors de cette étude, il s'agit de *mgrB* de fonction inconnue et d'*asr* impliqué dans la tolérance de l'acidité. Il ressort de l'induction des gènes reliés à la réponse au stress de la membrane externe et du périplasme que Zn^{2+} a un impact sur l'intégrité membranaire et/ou sur le fonctionnement de certaines protéines périplasmiques. Cet impact pourrait être très important *in vivo*, car la membrane externe des bactéries Gram négatives est l'interface au niveau de laquelle se produit l'interaction entre le milieu de l'organisme hôte et le pathogène. Par conséquent dans le cas des bactéries Gram négatives, toutes les modifications qui affectent la membrane externe et le périplasme doivent recevoir une attention particulière lors de l'étude des interactions hôte pathogène.

Les cations métalliques interagissent avec les lipopolysaccharides de la membrane externe, car les ions Mg^{2+} , le Fe^{2+} et le Zn^{2+} peuvent former des complexes avec le LPS par interaction de leurs charges positives avec les groupements chargés négativement du LPS. Le changement de la charge du LPS peut donc moduler l'accolement des cations métalliques. Les différents cations métalliques n'ont pas le même effet sur l'intégrité membranaire. Alors que la fixation du Fe^{2+} favorise l'oxydation des lipides membranaires et la formation des peroxydes organiques, le Zn^{2+} protège les lipides membranaires de l'oxydation. [143, 167] D'ailleurs, les gènes induits dans la présente étude incluent au moins un gène relié à la tolérance au stress oxydatif, il s'agit de *rsxA* qui une fois exprimé bloquera l'activation du senseur du stress oxydatif SoxR. L'induction de ce gène suggère que le stress oxydatif subi par les cellules d'*E. coli* est faible lors de cette étude, ce qui pourrait s'expliquer par les propriétés anti-oxydantes du Zn^{2+} excédentaire dans le milieu. Il faut souligner que le Zn^{2+} est le cofacteur enzymatique de nombreuses métallo-enzymes périplasmiques, dont la superoxyde-dismutase à Cu/Zn (SodC). Les lipides membranaires peuvent aussi être protégés contre le stress oxydatif par l'accolement du Zn^{2+} . [21, 167]

Enfin le Zn^{2+} excessif induit l'expression des flagelles (gènes *flgB*, *fliM*, *motB*) ce qui est probablement une réponse chimiotactique de fuite activée chez les cellules d'*E. coli* qui tentent de quitter le milieu pollué par le Zn^{2+} . De plus, FlhC le régulateur transcriptionnel des gènes flagellaires de classe II est une métalloprotéine Zn^{2+} -dépendante putative. [98, 168] Il est à noter que les gènes flagellaires étaient réprimés dans un milieu appauvri en Zn^{2+} . [154]

Les gènes réprimés lors de l'étude menée par le groupe de R. K. Poole incluent ceux impliqués dans l'expression des curli (les gènes *csgDFG*). Les curli sont des adhésines permettant la formation d'un type particulier de biofilm et leur répression peut être corrélée avec l'induction des flagelles en tant que réponse de fuite. Il est à noter que le régulateur de formation des curli *csgD* est réprimé par CpxR. Donc la répression des curli confirme l'implication de la réponse CpxR/CpxA dépendante dans la gestion du stress de la membrane externe, induit par une concentration excédentaire de Zn^{2+} .

La répression de *yrbL* confirme l'implication de PhoP/PhoQ dans la régulation du stress membranaire causé par Zn^{2+} et démontre que l'action de PhoP/PhoQ est modulée, puisque certains gènes PhoP/PhoQ dépendants sont induits alors que d'autres sont réprimés. La modulation est peut-être due à l'interaction entre les cascades régulatrices des systèmes à deux composantes PhoP/PhoQ et EvgA/EvgS. En effet *mgrB* et *yrbL* sont régulés en même temps par ces deux systèmes. [169] D'autres gènes régulés par EvgA/EvgS et réprimés dans cette étude sont *gadC*, *gadE*, *hdeA*, *hdeB* et *hdeD*. L'opéron *hdeA-D* est régulé indirectement par EvgA/EvgS en passant par GadE. Ces gènes sont impliqués dans la réponse à l'acidité, et leur répression concomitante avec l'induction du gène de la protéine de résistance à l'acidité *asr* peuvent être une adaptation à l'acidité de Lewis de Zn^{2+} . Ce type d'acidité n'implique pas nécessairement l'apparition des protons H^+ , ni le changement du pH du milieu (qui est d'ailleurs constant lors de cette étude en chémostat).

Des gènes impliqués dans la gestion du stress oxydatif sont aussi réprimés : *dps* induit par le stress oxydatif encode la protéine de protection de l'ADN qui capte le fer, *osmC* code pour une peroxydase protégeant contre les composés oxydants, et *sodC* code pour la superoxyde-dismutase périplasmique à Cu/Zn déjà citée plus haut. La répression de la transcription de ces gènes confirme l'absence de stress oxydatif.

Il est à noter qu'aucun des gènes des transporteurs impliqués dans l'import de Zn^{2+} (*znuA* /*znuCB* et *zupT*) n'est réprimé lors de cette étude. Ceci peut s'expliquer par le caractère dynamique de la population d'*E. coli* impliquée dans cette étude en chémostat. En effet, la population bactérienne en chémostat est en croissance constante, les nouvelles cellules ont donc besoin de synthétiser des métalloprotéines Zn^{2+} -dépendantes *de novo*, par conséquent les transporteurs qui importent le Zn^{2+} ne peuvent être réprimés même dans le milieu riche en Zn^{2+} utilisé lors de cette étude. L'excès de Zn^{2+}

disponible pour la cellule bactérienne dans ce milieu est compensé par une surexpression des transporteurs qui exportent Zn^{2+} , tels que ZntA et possiblement le complexe protéique Cus. Tout se passe donc comme si le Zn^{2+} entraît et sortait des cellules bactériennes en continu, en même temps qu'une homéostasie cellulaire de Zn^{2+} était à tout moment conservée.

Un autre point intéressant est qu'à la différence de Brocklehurst et Morby, le groupe de R.K. Poole n'a pas observé de diminution d'expression des porines de la membrane externe OmpA et OmpC (ompC est même induite dans l'étude réalisée par le groupe de R.K. Poole), ni d'induction des séquences d'insertion InsAB. Il se peut que ces observations différentes s'expliquent par le fait que la première étude a été réalisée en batch, alors que la seconde étude a été faite en chimostat. Donc dans la première étude la population analysée, se retrouve en phase stationnaire après avoir été soumise au stress toxique des cations métalliques, alors que dans la seconde étude la population est en croissance.

La croissance d'une population des cellules d'*E. coli* dans un milieu fortement concentré en Zn^{2+} se fait donc grâce à un ensemble d'adaptations gérées par un réseau complexe de régulateurs transcriptionnels. Ces adaptations concernent l'export du Zn^{2+} excédentaire par la cellule, la modification de la charge électronégative de la membrane externe, la résistance à l'acidité de Lewis de Zn^{2+} , l'accroissement de la mobilité cellulaire et possiblement une diminution des mécanismes de résistance au stress oxydatif.

Une autre étude de la réponse transcriptionnelle au Zn^{2+} excédentaire a été réalisée par Yamomoto et Ishihama. [159] La particularité de cette étude est qu'elle implique une population cellulaire d'*E. coli* en voie d'adaptation à la toxicité de Zn^{2+} et non pas une population déjà adaptée. Les gènes impliqués dans cette adaptation sont majoritairement différents de ceux cités dans les études du groupe de R. K. Poole et de Brocklehurst et Morby. Parmi les gènes réprimés on retrouve l'ATP-ase *znuC* faisant partie des gènes qui encodent le transporteur ZnuABC. Parmi les gènes induits on retrouve *zntA* encodant ZntA un des transporteurs responsables de l'export de Zn^{2+} , les gènes impliqués dans le métabolisme de la cystéine qui est un des principaux acides aminés impliqués dans la liaison de Zn^{2+} dans les métalloprotéines, les gènes des protéines ribosomales *rplV* et *rpsS* qui permettent de stocker le Zn^{2+} au sein des ribosomes et la protéase *degP* impliquée dans la dégradation des protéines dénaturées par le stress périplasmique.

La principale différence par rapport aux études précédentes impliquant un excès de Zn^{2+} est que l'expression du gène de l'ATP-ase *ZnuC* est réprimée lors de cette étude. Les auteurs ont d'ailleurs vérifié que la répression de *znuC* est antérieure à l'expression de *zntA*. Il est à noter que la répression de *znuC* dans un milieu riche en Zn^{2+} corrèle avec son expression dans un milieu appauvri en Zn^{2+} lors de l'étude réalisée par le groupe de Crowder. [154] Par contre, la répression de *znuA* et *znuB* n'a pas

été observée lors d'aucune des trois autres études impliquant un excès de Zn^{2+} . De même, l'expression des gènes des protéines ribosomales Zn^{2+} -dépendantes dans un milieu riche en Zn^{2+} , corrèle bien avec l'expression d'une protéine ribosomale indépendante du Zn^{2+} dans un milieu appauvri en Zn^{2+} . Par ailleurs, l'expression des gènes responsables de la biosynthèse de la cystéine, observée lors de cette étude, peut être due au fait que les métalloprotéines Zn^{2+} -dépendantes possèdent des sites structuraux de liaison au zinc contenant des cystéines. L'induction en réponse à l'excès de Zn^{2+} extracellulaire de l'expression du gène de la protéase périplasmique *degP* contrôlée par CpxR, est aussi décrite par le groupe de R.K. Poole. Ce résultat confirme qu'une concentration du Zn^{2+} extracellulaire excessive s'accompagne d'un stress de la membrane externe et du périplasma.

Donc l'adaptation d'une cellule d'*E. coli* à un excès de Zn^{2+} , implique du point de vue du transport la répression de l'ATP-ase ZnuC qui fournit l'énergie pour le fonctionnement de ZnuACB et l'expression accrue du transporteur ZntA. Du point de vue du stockage du Zn^{2+} cytoplasmique, on observe l'expression de protéines ribosomales et l'induction des gènes du métabolisme de la cystéine. Ces adaptations s'accompagnent d'un stress périplasmique et de membrane externe qui se traduit par l'induction de la protéase périplasmique DegP, responsable de la neutralisation des protéines aiguë dénaturées.

Deux études protéomiques réalisées par le groupe de Crowder complètent le tableau des adaptations d'*E. coli* au Zn^{2+} excédentaire. [157, 158] Dans la première de ces deux études, les auteurs démontrent que l'adaptation au stress causé par le Zn^{2+} extracellulaire est dépendante du temps. En effet, des protéines différentes sont affectées après 30 min et 4 heures d'exposition au Zn^{2+} excédentaire (200 μ M). Globalement, les changements affectent le métabolisme des acides aminés. Après 30 min, on observe l'expression accrue de l'aspartate amino transférase AspC et de la cystéine-synthétase CysE, ainsi qu'une diminution de l'expression de LeuC impliquée dans la synthèse de la leucine. Après 4 heures, le transport de l'histidine, lysine, ornithine, arginine, leucine, isoleucine et valine (HisJ, ArgT et LivJ), celui des transporteurs des oligopeptides (DppA et OppA) et la synthèse de la glutamine (GlnH) ont été inhibés. Il semble donc que l'excès de Zn^{2+} amène la cellule à optimiser son utilisation des acides aminés, probablement pour stocker le Zn^{2+} excédentaire, d'où la synthèse accrue de la cystéine et la baisse de production et du transport des autres acides aminés mentionnés plus haut. De plus, les transporteurs inhibés sont tous énergisés par l'ATP et la baisse de leur utilisation peut-être interprétée comme une mesure d'économie d'énergie. Il est à noter que les protéines membranaires n'ont pas été analysées dans le cadre de cette étude, ceci peut expliquer que les transporteurs membranaires du Zn^{2+} sont absents de cette étude. Il est par contre plus difficile de comprendre l'absence de variation de la quantité de la protéine de liaison périplasmique ZnuA, étant

donné que cette protéine est sensée être inhibée par l'excès de Zn^{2+} . Les auteurs de l'étude, tout en reconnaissant que la protéine ZnuA aurait du être détectée sur le gel à deux dimensions utilisé lors de leur étude, suggèrent que ZnuA était déjà très faiblement exprimée dans le milieu minimal de culture utilisé pour cultiver les cellules d'*E. coli* avant l'ajout du zinc excédentaire.

Dans une deuxième étude protéomique réalisée par le groupe de Crowder, les cellules ont été cultivées avec une quantité excédentaire de Zn^{2+} (250 μ M) pendant la nuit. Les résultats obtenus confirment certaines adaptations observées lors de la première étude. Ainsi, l'énolase Eno est induite dans les deux études. L'expression de la cystéine-synthétase CysK confirme la synthèse accrue de la cystéine observée lors de la première étude. L'expression du transporteur de la histidine HisJ est diminuée dans la deuxième étude autant que dans la première. D'autres résultats de cette étude semblent confirmer certains de ceux obtenus lors des études transcriptionnelles. Ainsi, l'augmentation de l'expression de la protéine ribosomale L9 (RplI) valide le rôle des ribosomes dans le stockage du Zn^{2+} , alors que la diminution de l'expression de la superoxyde-dismutase à Mn^{2+} (SodA) semble confirmer la diminution du stress oxydatif cellulaire en présence de Zn^{2+} excédentaire. Par contre, l'induction de la porine OmpA semble contredire les résultats obtenus par Brocklehurst et Morby. Les auteurs suggèrent que OmpA est une porine dont l'expression est affectée par différents types de stress, mais n'expliquent pas pourquoi leurs résultats contredisent ceux de Brocklehurst et Morby.

En conclusion à toutes ces études sur l'adaptation des cellules d'*E. coli* à des niveaux excédentaires ou insuffisants de Zn^{2+} , nous pouvons affirmer que l'homéostasie cellulaire de Zn^{2+} affecte un large éventail de fonctions cellulaires. Le Zn^{2+} est indispensable, mais en excès il est toxique, son homéostasie cellulaire est donc assurée de façon très précise. Chez les procaryotes, on retrouve en première ligne de la gestion de l'homéostasie cellulaire le transport de Zn^{2+} qui est strictement régulé.

III i Transporteurs bactériens du zinc :

Les transporteurs bactériens de Zn^{2+} peuvent être divisés en deux grands groupes : d'une part ceux qui en assurent l'entrée et d'autre part ceux qui en assurent l'efflux. Parmi ceux qui assurent l'entrée du Zn^{2+} on distingue deux types de transporteurs : transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) de l'amas C9 et les transporteurs ZIP (*ZRT IRT like Proteins*) encore appelés SLC39 (*Solute Ligand Carrier 39*). [63, 128] Les premiers sont typiquement bactériens alors que les seconds sont distribués parmi les organismes des trois règnes (nous les avons déjà mentionnés dans la section portant sur le transport du zinc chez l'organisme hôte). Quant à ceux qui assurent l'efflux ils se subdivisent en trois groupes : les transporteurs CDF (*Cation Diffusion Facilitators*), aussi appelés SLC30 (*Solute Ligand*

Carrier 30), les pompes à efflux dépendantes de l'ATP et les systèmes RND (*Resistance Nodulation Cell Division*) à composantes multiples. Là encore, les systèmes RND et les pompes d'efflux dépendantes de l'ATP sont bactériennes, alors que les transporteurs CDF sont retrouvés chez les organismes des trois règnes. [14, 128] La nomenclature des transporteurs n'est pas commune entre eucaryotes et procaryotes. Ainsi les transporteurs CDF eucaryotes sont tous nommés Znt et sont numérotés, de même les transporteurs ZIP eucaryotes sont tous nommés Zip et sont numérotés. [170]

Par contre, la nomenclature des transporteurs bactériens est beaucoup moins uniformisée, ainsi les transporteurs ZntA bactériens n'appartiennent pas à la famille CDF, mais sont bien des pompes à efflux dépendantes de l'ATP, alors que le transporteur ZIP d'*E. coli* est nommé ZupT et que les deux transporteurs CDF d'*E. coli* sont nommés respectivement ZitB (*Zinc iron transporter*) et YiiP. Quant aux systèmes RND, ils ne sont pas toujours très spécifiques par rapport au substrat dont ils assurent l'efflux. Chez *E. coli* il semble que ce soit le système Cus, impliqué dans la détoxification des ions Cu^{2+} et Ag^{2+} qui semble induit lors de l'excès de Zn^{2+} , alors que chez d'autres bactéries c'est le système Czc qui exporte les ions Co^{2+} , Zn^{2+} et Cd^{2+} . [155, 171] Il aurait certainement été souhaitable que la nomenclature bactérienne des divers transporteurs soit aussi uniforme que celle des eucaryotes, mais il est possible que la diversité inhérente au monde bactérien y fasse obstacle. Enfin, il est possible qu'un certain nombre de transporteurs avec une forte affinité pour d'autres ions puissent importer le Zn^{2+} de façon adventice. Par exemple, cette possibilité a été suggérée pour CorA, un transporteur ayant une haute affinité pour le Mg^{2+} . [148]

III j Entrée du Zn^{2+} dans la cellule bactérienne :

De même que d'autres ions des métaux de transition tels que le fer ou le manganèse, l'ion Zn^{2+} est capable de s'accoler aux charges électronégatives du LPS au niveau de la membrane externe. [172] Le Zn^{2+} est sensé diffuser librement à travers la membrane externe des bactéries Gram négatives, probablement grâce à des porines qui ne sont pas spécifiques du Zn^{2+} . C'est une des explications possibles de l'altération de la transcription des gènes encodant les porines, lors des études impliquant l'exposition des cellules d'*E. coli* à des concentrations excédentaires de Zn^{2+} .

Par contre, des transporteurs sont nécessaires pour permettre l'entrée de Zn^{2+} à travers la membrane cytoplasmique. Deux transporteurs sont reconnus chez *E. coli* K-12 comme étant capables de permettre le passage de Zn^{2+} du périplasme vers le cytoplasme. Il s'agit des transporteurs ZnuACB et ZupT. ZnuACB est en général considéré comme étant le transporteur de haute affinité et aussi le plus sélectif des deux transporteurs, ZupT quant à lui est vu comme étant un transporteur d'affinité et

de spécificité moindre. [21] Il est à noter que les appréciations concernant l'affinité et la spécificité de ces deux transporteurs ne sont pas basées sur une étude comparative de leurs caractéristiques.

III k ZnuACB fonctionnement et régulation:

ZnuACB appartient à la famille des transporteurs ABC (*ATP- Binding- Cassette*) dépendants d'une protéine de liaison périplasmique (dimère ZnuA) qui capte les ions Zn^{2+} avant de les transférer à la perméase membranaire (dimère de ZnuB) énergisée par une ATP-ase (dimère ZnuC). [173] Une étude bioinformatique a classé ZnuACB dans la famille C9 des transporteurs bactériens de Mn^{2+} et Zn^{2+} , ce transporteur appartient donc à la même catégorie de transporteurs ABC que SitABCD le transporteur de Mn^{2+} et Fe^{2+} des souches ExPEC. [63] Il est d'ailleurs difficile de distinguer les transporteurs bactériens de Mn^{2+} des transporteurs de Zn^{2+} . [21]

L'architecture protéique de ZnuACB est caractéristique de ce type de transporteur ABC avec quelques spécificités qui sont probablement dues au substrat transporté. ZnuA est la protéine qui sera sécrétée dans le périplasme afin de lier les ions de Zn^{2+} qui arrivent dans ce compartiment cellulaire après avoir traversé la membrane externe. Comme les protéines homologues des autres transporteurs, ZnuA a la forme d'un haltère dans lequel les domaines C et N-terminaux sont reliés ensemble par une hélice alpha. Il est possible que les hélices alpha de deux protéines ZnuA puissent interagir pour former un dimère. ZnuA est similaire à d'autres protéines périplasmiques de liaison (PLPB pour *Periplasmic Ligand Binding Protein*) de la famille C9 des transporteurs ABC, à l'exception d'une boucle riche en histidine et réfractaire à la cristallisation. Ces domaines riches en histidine seraient caractéristiques des protéines périplasmiques qui interagissent avec Zn^{2+} , telles que la superoxyde-dismutase à Cu^{2+}/Zn^{2+} SodC ou la lipocaline périplasmique YodA induite lors d'un manque du Zn^{2+} ou d'un excès de Co^{2+} . [174] Il est intéressant de noter que des interactions de transfert de Zn^{2+} entre des protéines ayant des motifs riches en histidine semblent probables puisque ZnuA est capable de capter le Zn^{2+} contenu dans SodC et que l'homologue de ZnuA chez certaines bactéries Gram positives est une protéine dont le domaine C-terminal est fusionné à un domaine homologue à YodA. [174, 175]

Plusieurs études ont été consacrées à la structure protéique de ZnuA. [65, 176-179] Le groupe de Pakrasi a été le premier à obtenir une structure cristalline de ZnuA de *Synechocystis* 6803. Ils ont observé la présence d'une boucle mobile et riche en résidus chargés, surtout des histidines, qui était particulière aux protéines périplasmiques de liaison des transporteurs spécifiques de Zn^{2+} . Ils ont suggéré que le rôle de cette boucle était de faciliter la concentration des ions Zn^{2+} autour du site de liaison de la protéine. La présence de cette boucle, ainsi que l'utilisation d'un site de liaison des métaux avec seulement trois résidus d'acides aminés ligands, auraient permis une affinité plus élevée

pour le Zn^{2+} et une spécificité plus stricte pour cet ion au dépens du Mn^{2+} . Dans le site de liaison, le Zn^{2+} serait lié par les résidus His 83, 179 et 243 ainsi qu'une molécule d'eau (Zn^{2+} lie fréquemment les molécules d'eau dans diverses métallo-enzymes). Cette configuration particulière du site de liaison de l'ion Zn^{2+} , qui diffère de la configuration tétraédrique habituelle, permettrait à ZnuA de capter les ions Zn^{2+} avec suffisamment de spécificité et en même temps une affinité appropriée pour pouvoir céder l'ion au dimère ZnuB de la perméase membranaire. Ainsi, à la différence des autres transporteurs ABC de l'amas C9, ZnuACB serait à même jouer le rôle de transporteur spécifique de Zn^{2+} . [176]

Cette étude structurale de ZnuA de *Synechocystis* 6803 a été suivie par une étude réalisée sur ZnuA d'*E. coli* par le groupe de Sharma. [179] L'étude suggère une liaison de Zn^{2+} par les résidus His60, His143, His207 et une molécule d'eau. À la différence de ce qui a été suggéré pour ZnuA de *Synechocystis*, un quatrième résidu d'acide aminé : Glu59, proche de la molécule d'eau pourrait aussi être impliqué dans la liaison de Zn^{2+} , ce qui rendrait le site de liaison de ZnuA plus en conformité avec la forme en tétraèdre, habituelle pour la liaison de Zn^{2+} . Comme chez les autres PLPB de la famille C9 le site de liaison du métal se retrouve à l'interface entre le domaine C-terminal et N-terminal de la protéine. Après comparaison avec d'autres PLPBs de la famille C9, cette étude confirme que ZnuA tout en présentant des caractéristiques communes aux autres PLPBs, possède aussi des caractéristiques conformationnelles distinctes. De plus, cette étude suggère que des changements de conformation devraient accompagner la liaison de l'ion Zn^{2+} et aussi son transfert à la perméase ZnuB₂. Ainsi ZnuA aurait une structure protéique dotée de suffisamment de plasticité pour permettre des modifications dynamiques entre l'état « libre » (apoprotéine) et « chargé » (ligand de Zn^{2+}). Il est probable que cette plasticité soit importante pour le fonctionnement de ZnuACB.

Une autre étude portant sur la structure de ZnuA d'*E. coli* et publiée la même année par Li et Jogl, confirme que cette protéine a des caractéristiques particulières (par exemple un pont disulfure qui n'existe pas chez les autres PLBP de la famille C9). [178] Cette étude souligne que la boucle mobile riche en résidus His est plus courte chez *E. coli* que chez *Synechocystis*. Cette étude suggère aussi qu'à la différence de ZnuA de *Synechocystis*, ZnuA d'*E. coli* assure la liaison de Zn^{2+} par un site composé de quatre ligands : His78, His161, His225 et Glu77 et ne fait pas état d'une liaison de coordination du Zn^{2+} à une molécule d'eau. Globalement, cette étude confirme les données du groupe de Sharma, les différences des coordonnées des résidus des acides aminés ligands provenant du fait que les deux équipes ont choisi deux méthionines différentes en tant qu'acide aminé de départ de la protéine.

Les différences de fonctionnement entre ZnuA et les autres PLPBs de la famille C9, ont été analysées dans une étude portant sur les caractéristiques de ZnuA et TroA de *Treponema pallidum*. [30] TroA est chez les tréponèmes la protéine homologue de SitA des entérobactéries. TroA appartient

donc à la même famille que ZnuA et est capable de lier non seulement le Mn^{2+} , mais aussi le Zn^{2+} et le Fe^{2+} . Une controverse entourait le rôle réel de TroA : protéine de transport de Mn^{2+} ou protéine de transport de Zn^{2+} . [180] Dans une étude soignée, les auteurs ont réussi de déterminer que TroA est une PLBP liant Mn^{2+} , Fe^{2+} et Zn^{2+} avec une haute affinité, alors que ZnuA ne liait avec une très haute affinité que Zn^{2+} . ZnuA contenait plusieurs sites de liaison à Zn^{2+} de différentes affinités, dont deux d'affinité forte : un étant localisé à l'interface entre les domaines C et N-terminaux et un autre au niveau de la boucle riche en résidus His. Les sites d'affinité plus faible étant localisés au niveau de la boucle riche en His. Comme suggéré pour ZnuA d'*E. coli*, ZnuA de *T. pallidum* subissait des modifications de structure lors de liaison à Zn^{2+} , alors que TroA n'en subissait pas. Il semble donc que grâce à ses caractéristiques structurales, ZnuACB est le transporteur spécifique du Zn^{2+} alors que TroABCD est un transporteur avec un plus large éventail d'ions transportés. De plus, les deux transporteurs ZnuACB et TroABCD étaient co-exprimés chez *T. pallidum* lors de l'infection expérimentale chez le lapin. Ceci suggère que l'intervention de ZnuA libère TroA de la liaison au Zn^{2+} et lui permet de transporter en priorité Mn^{2+} et Fe^{2+} . Enfin, ces résultats suggèrent un rôle potentiel pour les systèmes Tro et Znu dans la virulence des tréponèmes.

La participation de la boucle riche en His de ZnuA de *Synechocystis* au transport a été analysée dans une nouvelle étude réalisée par le groupe de Pakrasi. [177] Les sites de liaison au Zn^{2+} situés dans la boucle, seraient d'affinité plus faible et leur perte n'affecterait pas la liaison de Zn^{2+} au site de liaison d'affinité plus élevée qui se retrouve entre les domaines C et N-terminaux de la protéine. De plus, les auteurs de cette étude confirment chez ZnuA de *Synechocystis* les changements conformationnels suggérés pour ZnuA d'*E. coli* et observés dans le cas de ZnuA de *T. pallidum*. Enfin, les auteurs suggèrent que la boucle riche en His pourrait avoir un rôle dans la détection du taux de Zn^{2+} périplasmique, mais ne fournissent pas de données expérimentales pour soutenir cette suggestion.

La dernière et la plus récente étude portant sur la structure / fonction de ZnuA, a été réalisée avec la protéine d'*E. coli* par le groupe de Crowder. [65] Leur publication fait en quelque sorte le pont entre les diverses études que nous avons citées plus haut. En effet, les auteurs confirment que les résidus His et Glu décrits par le groupe de Sharma et Li et Jogl sont effectivement impliqués dans la liaison de haute affinité de Zn^{2+} à l'interface des domaines C et N-terminaux de la protéine. De plus, les auteurs confirment que de même que ZnuA de *T. pallidum*, ZnuA d'*E. coli* possède au moins un autre site de liaison de haute affinité pour Zn^{2+} qui se trouve dans la boucle riche en His. Les auteurs confirment aussi les changements conformationnels qui surviennent lors de la liaison de Zn^{2+} par ZnuA. Enfin, les auteurs confirment que ZnuA n'est pas capable de lier le Mn^{2+} , mais lie Zn^{2+} avec

une haute affinité (K_d estimé < 20 nM) et est aussi capable de lier d'autres ions métalliques : Co^{2+} , Ni^{2+} , Cu^{2+} , Cu^+ , et Cd^{2+} .

En faisant la synthèse des résultats de toutes ces études, nous pouvons affirmer que ZnuA d'*E. coli* est hautement spécifique du Zn^{2+} au détriment de Mn^{2+} . De plus, la liaison de Zn^{2+} à ZnuA implique plusieurs sites d'affinité diverse et des changements de conformation qui accompagnent la liaison et probablement le relâchement du Zn^{2+} lors du fonctionnement de ZnuA et de son interaction avec ZnuB₂. Enfin, la boucle riche en His est probablement importante pour le fonctionnement du transporteur ZnuACB, même si elle n'est pas importante pour la liaison de forte affinité du Zn^{2+} . Toutes ces caractéristiques font que ZnuACB apparaît comme le principal ou même le seul transporteur ABC de Zn^{2+} chez les espèces bactériennes qui le possèdent.

Lors du transport du Zn^{2+} , ZnuA interagit avec la perméase membranaire formée par le dimère des protéines ZnuB. La protéine ZnuB est beaucoup moins bien caractérisée que la protéine ZnuA. En fait, les perméases des transporteurs ABC sont en général beaucoup moins bien étudiées que les PLBPs ou les ATP-ases de ces systèmes. La principale raison de ce manque d'information sur les perméases des systèmes ABC est tout simplement la difficulté de cristalliser ces protéines membranaires intégrales. Nous devons donc inférer les modalités de fonctionnement de la perméase ZnuB₂ de ce qui est connu à propos des perméases des autres transporteurs ABC. Nous allons pour ce faire utiliser quelques revues publiées sur le fonctionnement des transporteurs ABC et des articles qui portent sur la structure cristalline du transporteur ABC de la vitamine B12. [181-184]

Avant tout, ZnuB est une protéine membranaire intégrale qui forme le domaine transmembranaire (TMD) du transporteur ZnuACB. De même que les autres TMD le dimère ZnuB est hydrophobe et replié en de nombreuses hélices alpha qui se trouvent à l'intérieur de la membrane. Le passage du substrat se fait à l'interface des deux protéines ZnuB qui forment le dimère. Au repos, la conformation de ZnuB est telle que le site de liaison du substrat est exposé au périplasma, alors que le passage vers le cytoplasme à travers l'interface entre les deux protéines ZnuB₂ est fermé par des boucles des deux chaînes protéiques. Lors de liaison de ZnuA chargé de Zn^{2+} au dimère ZnuB₂, un changement de conformation fournit le signal nécessaire à l'hydrolyse de l'ATP par l'action coopérative du dimère d'ATP-ases ZnuC₂. L'hydrolyse d'ATP fournit l'énergie nécessaire au changement de conformation qui pousse le Zn^{2+} lié à la perméase à travers la cavité formée par l'interface du dimère ZnuB₂, du site de liaison ouvert sur le périplasma, vers le site de relâchement du substrat ouvert sur le cytoplasme. En même temps la PLBP ZnuA liée à la perméase ZnuB₂ occulte l'entrée de la perméase, prévenant ainsi la ressortie du Zn^{2+} vers le périplasma. Une fois le Zn^{2+} passé à travers la cavité, la PLBP ZnuA se détache de la perméase transmembranaire, le dimère ZnuB₂ de la

perméase revient à la conformation de repos, alors que les deux ATP-ases relâchent l'ADP produit lors de lyse de l'ATP et se retrouvent de nouveau prêtes à réaliser l'hydrolyse de l'ATP. De même que la PLBP ZnuA, la perméase ZnuB₂ contribue à reconnaître le substrat et donc à conférer au transport sa spécificité. Il est à noter que dans le système de transport SitABCD qui est assez semblable de ZnuACB, la perméase est formée d'un hétérodimère SitC/SitD ce qui peut favoriser le passage de Mn²⁺ et Fe²⁺ au détriment de Zn²⁺.

Les ATP-ases sont la partie la plus conservée des transporteurs ABC et leur structure est assez bien connue. En effet ces protéines, qui s'associent au dimère de la perméase transmembranaire du côté cytoplasmique, sont assez hydrophiles et sont donc plus faciles à obtenir en vue d'une cristallisation. ZnuC comme les autres ATP-ases contient les motifs conservés typiques de cette famille protéique. Dans l'ordre ces séquences conservées apparaissent aux positions suivantes de la chaîne peptidique : un acide aminé aromatique en position 14 environ, le motif Walker A entre les positions 36 à 44 environ, la boucle Q environ entre 83 à 86, la signature ABC environ entre 140 à 144, le motif Walker B environ entre 160 à 167, la boucle D environ de 170 à 171 et la boucle H environ entre 195 et 197 de la chaîne peptidique. Lors de l'hydrolyse de l'ATP, deux protéines de ZnuC lient deux molécules d'ATP qui se retrouvent à l'interface entre le dimère des protéines. Les protéines ZnuC n'interagissent qu'au moment de l'hydrolyse de l'ATP et leur interaction est transitoire, mais indispensable au fonctionnement du transporteur. Il est possible que les deux protéines sont couplées allostériquement, donc les changements conformationnels de l'une ont un impact sur l'autre et *vice et versa*. L'hydrolyse de l'ATP n'implique pas la phosphorylation transitoire des protéines. Les différentes séquences conservées citées plus haut et caractéristiques de cette famille de protéines sont toutes importantes pour former des interactions avec l'ATP à différentes étapes de l'hydrolyse. L'hydrolyse de deux molécules d'ATP par ronde de transport est réalisée de façon coopérative par les deux ATP-ases, les deux fournissant des séquences peptidiques qui interviennent conjointement dans l'hydrolyse de chacun des deux ATP. [182]

Le transport de Zn²⁺ par le transporteur ZnuACB est donc énergétiquement coûteux et implique des interactions protéiques complexes. C'est une des raisons probables de la régulation transcriptionnelle stricte de l'expression des gènes des opérons *znuA* et *znuCB*. Nous proposons une représentation schématique du fonctionnement d'un transporteur ABC dans la figure 4.

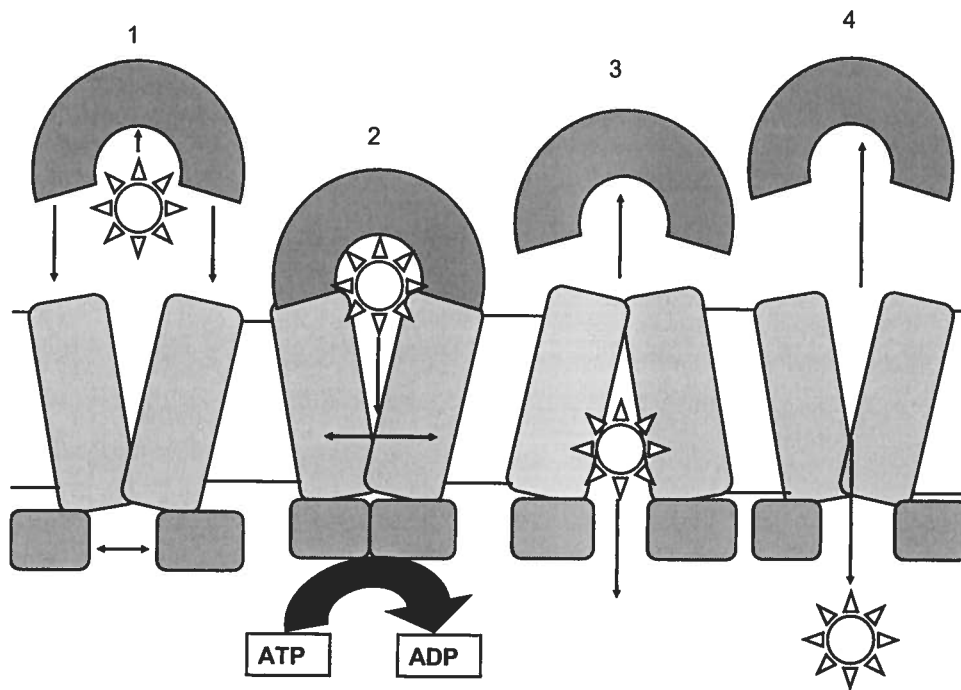


Fig.4 : Représentation schématique du fonctionnement d'un transporteur ABC : (1) Le soluté transporté est capté dans le périplasma par la protéine de liaison périplasmique (PLBP), cette liaison permet à la PLBP chargée de se lier au dimère de la perméase membranaire qui est ouverte vers le périplasma, cette liaison provoque une interaction entre les ATP-ases cytoplasmiques. (2) Les ATP-ases cytoplasmiques procèdent conjointement à la lyse de 2 molécules d'ATP, ce qui fournit l'énergie nécessaire au changement conformationnel du dimère de la perméase. (3) La perméase change de conformation, ce qui permet une ouverture vers le cytoplasme, le substrat est transporté vers le cytoplasme, alors que la PLBP se libère et retourne vers le périplasma. (4) Le substrat est passé dans le périplasma, le transporteur revient à sa conformation initiale. ZnuACB et SitABCD appartiennent à cette famille de transporteurs. Les transporteurs ABC qui ciblent les ions métalliques sont très nombreux et diversifiés. Bien que leur mécanisme de transport soit très conservé, on peut les subdiviser en amas (*clusters*) selon leur substrat cible. Ainsi ZnuACB et SitABCD font partie du même amas de transporteurs : C9 qui réunit les transporteurs de manganèse, zinc et fer divalents et correspond à la famille des transporteurs TroA, nommée selon le transporteur des ions métalliques de *Treponema pallidum*.

Chez *E. coli* le fonctionnement de ZnuACB et sa régulation transcriptionnelle par le répresseur Zn^{2+} -dépendant Zur ont été décrits par Patzer et Hantke. [173, 185] Les opérons *znuA* et *znuCB* étaient exprimés dans un milieu riche en fer et réprimés en milieu pauvre en fer. Leur expression était aussi renforcée par la présence de manganèse. Le chélateur EGTA permettait aussi l'induction de ces opérons alors que le Zn^{2+} les bloquait. Le mutant *znuA* d'*E. coli* poussait moins bien dans un milieu contenant 5 mM d'EGTA. Ce défaut de croissance était corrigé par l'ajout de Zn^{2+} . Dans un milieu

contenant 0,5 mM d'EGTA, seule la souche isogène parentale et non pas le mutant *znuA*, était capable d'accumuler l'isotope radioactif $^{65}\text{Zn}^{2+}$. Ce transport était dépendant de l'ATP. Par contre, à des concentrations élevées de Zn^{2+} la souche mutante *znuA* accumulait plus de Zn^{2+} que la souche isogène parentale. Enfin, l'expression du transporteur ZnuACB encodé par les opérons *znuA* et *znuCB* était réprimée de façon Zn^{2+} -dépendante par le régulateur transcriptionnel Zur encodé par le gène *zur* identifié lors de cette même étude. [173]

Il est curieux que l'expression des opérons *znuA* et *znuCB* ait été affectée par le taux de fer disponible dans le milieu et par la présence de manganèse dans celui-ci, mais les auteurs n'ont pas élaboré plus sur ce sujet. Une autre observation intéressante faite lors de cette étude, a été que le mutant *znuA* placé en milieu riche en Zn^{2+} , accumule plus de zinc que la souche isogène parentale. Les auteurs de cette étude ne fournissent aucune hypothèse pour expliquer cette observation.

Dans une étude subséquente, les mêmes auteurs se sont intéressés plus à la régulation de l'expression à partir des promoteurs des opérons *znuA* et *znuCB*. Ils ont démontré que Zur forme des dimères qui lient des ions Zn^{2+} à raison de deux ions par dimère. La dimérisation de Zur n'était pas inhibée par les chélateurs. Par contre les chélateurs inhibaient la liaison de Zur à l'ADN, alors que Zn^{2+} en faible quantité favorisait cette liaison. Le site de liaison de Zur était une séquence palindromique d'environ 30 pb qui chevauchait le site de départ transcriptionnel de *znuA*. Le site de liaison à l'ADN était proche de l'extrémité N-terminale de la chaîne peptidique de Zur, alors que le site de dimérisation et de la fixation du Zn^{2+} était proche de l'extrémité C-terminale de celle-ci. Enfin, Zur ne semblait pas assurer sa propre régulation transcriptionnelle, comme c'est le cas avec un autre régulateur transcriptionnel semblable : le répresseur du transport de fer Fur. [185] Un des points importants que cette étude n'a pu éclairer est la régulation transcriptionnelle de *zur*.

Des études par Outten et ses collaborateurs ont tenté d'apporter des éclaircissements à l'action de Zur en tant que régulateur transcriptionnel. [22, 186] Ces études ont confirmé que Zur agit en tant que dimère et démontré que Zur est capable de lier deux ions Zn^{2+} par monomère. Le nombre de Zn^{2+} liés au dimère est donc deux fois supérieur à celui suggéré par Patzer et Hantke. Le nombre suggéré par Outten et Tobin est plus similaire de ce qu'on observe avec Fur, un autre régulateur transcriptionnel de la même famille. En effet, Fur aussi s'assemble en dimères dans lequel chacun des monomères comporte un ion de Zn^{2+} structural, par la suite chacun des dimères lie deux ions de Fe^{2+} et devient un régulateur transcriptionnel actif. [162] De façon similaire, Zur comporte probablement un ion de Zn^{2+} structurel et le dimère lie aussi deux ions de Zn^{2+} qui le rendent capable de se fixer à l'ADN au niveau de sa séquence de liaison. [186] Outten et ses collaborateurs ont démontré que l'affinité de Zur pour le Zn^{2+} est tellement élevée (de l'ordre du femtomole) qu'il est impossible que le Zn^{2+} soit libre dans le

cytosol cellulaire d'*E. coli*. Ils ont aussi démontré que les cellules d'*E. coli* sont capables d'accumuler beaucoup plus de Zn^{2+} qu'il n'y en a dans le milieu environnant. Dans le milieu minimal utilisé lors de leur étude les auteurs ont estimé que le facteur de concentration du Zn^{2+} entre la cellule d'*E. coli* et l'environnement était d'environ 2000. Ces deux résultats suggèrent que bien qu'une quantité substantielle de Zn^{2+} est disponible dans la cellule (2×10^5 ions Zn^{2+} par cellule au moins), la totalité de ce Zn^{2+} cellulaire doit être lié. Cela implique aussi que les ions Zn^{2+} sont directement transférés d'une métalloprotéine à une autre. [22]

Malgré les précisions apportées par ces études quant à l'affinité de Zur pour Zn^{2+} et son mode de fonctionnement, la régulation transcriptionnelle de l'opéron *zur* reste inconnue. Une des possibilités est que la régulation par Zur soit en interaction avec la régulation par un ARN non codant de petite taille. C'est le cas de Fur, homologue de Zur impliqué dans la gestion de l'homéostasie du fer, dont le circuit régulateur est complété par celui régulé par l'ARN non codant RyhB. [27] Dans le cas de Zur l'existence possible de ce type de contrôle transcriptionnel complémentaire n'a jamais été étudiée.

Une autre possibilité est que la transcription de *zur* serait constante et que Zur serait toujours présent dans le cytoplasme cellulaire sous la forme d'un monomère (ou d'un dimère) inactif. Si le Zn^{2+} cytosolique devient excédentaire par rapport aux sites de liaison de Zn^{2+} dans les diverses métalloprotéines Zn^{2+} -dépendantes, le dimère Zur_2 actif serait formé en liant deux Zn^{2+} supplémentaires. Il est à noter que Zur, de même que les autres régulateurs du transport des ions métalliques, contrôle aussi d'autres aspects du métabolisme cellulaire du métal qu'il lie. Par exemple, Zur régule aussi l'utilisation des métalloprotéines zinc dépendantes dans les ribosomes. Chez *E. coli* ces métalloprotéines zinc dépendantes ribosomales contiennent environ 25% du zinc cellulaire total et servent à l'entreposage de ce métal. Nous avons présenté la régulation par Zur (et par les autres facteurs transcriptionnels qui interviennent dans la régulation des transporteurs de métaux) dans la figure 5.

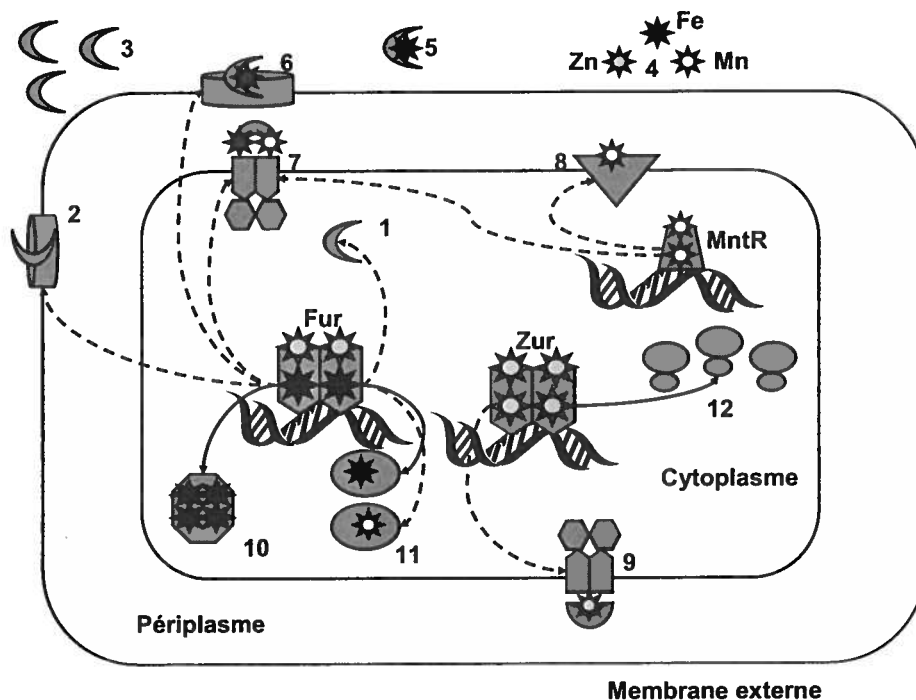


Fig.5 : Représentation schématique des régulateurs du transport des métaux. Les flèches à ligne pointillée représentent l'inhibition, alors que les flèches à ligne continue représentent l'induction. (1) Production des sidérophores par des enzymes cytoplasmiques. (2) Excrétion des sidérophores. (3) Sidérophores. (4) Ions métalliques dans l'environnement extracellulaire. (5) Capture des ions du fer par les sidérophores. (6) Transport des sidérophores chargés par les transporteurs spécifiques. (7) Transport de Fe^{2+} et Mn^{2+} par SitABCD. (8) Transporté Mn^{2+} par MntH. (9) Transport du zinc par ZnuACB. (10) Entreposage du fer et son incorporation dans les métalloprotéines. (11) Superoxyde-dismutase à Mn et Fe. (12) Entreposage du zinc dans les ribosomes.

III | ZupT :

ZupT appartient à la famille des protéines ZIP, aussi appelée SLC39, qui est ubiquitaire dans les trois règnes du vivant. [126] ZupT d'*E. coli* a d'ailleurs été identifié par homologie avec un transporteur de la levure. [187] En plus de zinc, ces transporteurs sont capables de permettre le transport du fer, manganèse et cadmium, ZupT est donc beaucoup moins spécifique que ZnuACB. [188] Le mécanisme de transport par ZupT est inconnu, mais il est généralement admis que le transport devrait dépendre d'un gradient chimiosmotique de part et d'autre de la membrane périplasmique. Il a été suggéré que le transport de Zn^{2+} par les protéines Zip est énergisé chez les eucaryotes par le transport concomitant des carbonates.

La structure de ZupT est similaire à celle des autres protéines de la même famille. C'est une protéine membranaire intégrale à l'exception des parties C et N-terminales qui se retrouvent du côté

périplasmique de la membrane cellulaire. La chaîne protéique traverse la membrane cellulaire huit fois formant des domaines transmembranaires numérotés de I à VIII. Une extension cytoplasmique dont la longueur varie parmi les protéines Zip se retrouve entre le domaine III et le domaine IV, cette région est riche en résidus His et sa conservation entre les diverses protéines ZIP suggère qu'elle est importante pour leur fonction.

Chez *E. coli*, l'équipe de Grass a été la première à décrire un transporteur Zip bactérien. Les auteurs de l'étude ont démontré que ZupT permettait la croissance résiduelle d'un mutant $\Delta znuACB$ en milieu minimal dont les ions ont été chélatés par l'EDTA. La croissance d'un mutant $\Delta zupT$ n'était que très faiblement affectée dans ce milieu. Par contre la croissance du double mutant $\Delta znuACB \Delta zupT$ était très affectée. L'EDTA est un chélateur extracellulaire et non spécifique, mais ce phénotype pouvait être rectifié par l'addition de Zn^{2+} et non d'autres ions. De plus, l'expression de ZupT à partir d'un vecteur d'expression inductible rendait *E. coli* plus sensible à la toxicité de Zn^{2+} . Enfin, l'expression de ZupT à partir d'un vecteur inductible permettait une accumulation de l'isotope radioactif $^{65}Zn^{2+}$. Tous ces résultats montrent que ZupT transportait le Zn^{2+} . [187]

Par la suite, la même équipe a voulu caractériser plus pleinement la spécificité du transport par ZupT. En effet, les protéines Zip sont connues comme étant fréquemment capables d'importer plus d'un type d'ion métallique. Lors de cette seconde étude, ZupT contribuait à l'accumulation de fer dans une souche d'*E. coli* ayant perdu les autres transporteurs de Fe^{2+} et Fe^{3+} . De plus, l'expression de ZupT à partir d'un plasmide inductible rendait la cellule plus sensible à la toxicité de Co^{2+} et de Mn^{2+} . Enfin, la régulation de *zupT* ne semblait pas liée à la teneur du milieu en ions métalliques et les auteurs en ont conclu que *zupT* est exprimé constitutivement à un faible niveau. Cette étude confirme donc que comme d'autres protéines Zip, ZupT permet l'import de plusieurs ions métalliques divalents différents *in vitro*. [188] Nous proposons une représentation schématique du fonctionnement d'un transporteur énergisé par gradient chimiosmotique dans la figure 6.

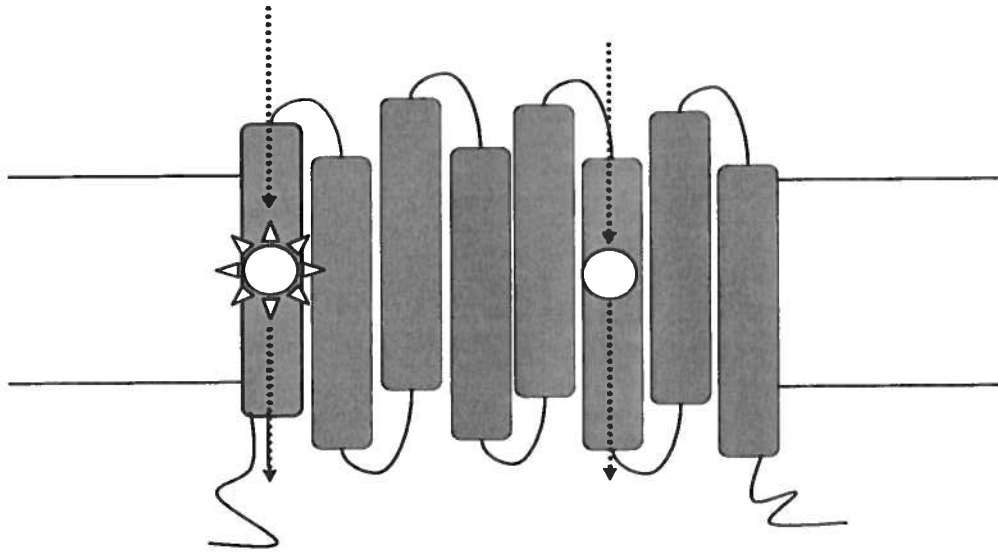


Fig.6 : Représentation schématique d'un transporteur énergisé par un gradient chimiosmotique : Les transporteurs à gradient chimiosmotique n'ont pas de composante protéique périplasmique, il s'agit de protéines membranaires intégrales. Ces protéines sont formées d'un certain nombre de domaines transmembranaires TMDs (pour *transmembranar domain*), certains TMDs sont plus indispensables pour le transport. Le transport d'un soluté contre le gradient de concentration est couplé à celui d'un substrat cotransporté selon son gradient de concentration. Les transporteurs Zip (par exemple ZupT) et Nramp (par exemple MntH) appartiennent à ce groupe diversifié de transporteurs. La relation phylogénétique entre les différents transporteurs énergisés par le gradient chimiosmotique est lointaine et tenue, ces transporteurs sont subdivisés en familles selon leur substrat cotransporté et leur soluté cible.

III m Résistance à la toxicité du zinc :

Comme la majorité des autres métaux, le zinc est toxique quand il est présent en forte quantité. Les caractéristiques physicochimiques du Zn^{2+} en font un très bon ligand pour les métalloprotéines. La toxicité du zinc est donc surtout due à la capacité du zinc de remplacer les autres métaux de transition dans les sites de liaison des métalloprotéines qui en dépendent et par conséquent de les désactiver. [6] Les cellules bactériennes ont acquis des mécanismes qui leur permettent de résister à la toxicité du Zn^{2+} et des autres métaux toxiques afin de préserver l'homéostasie cellulaire. Ces mécanismes sont les suivants : précipitation des métaux toxiques sous forme de sels à l'extérieur de la cellule, modifications de la paroi cellulaire afin d'en diminuer la perméabilité, diminution d'entrée à travers les transporteurs assurant l'import, séquestration intracellulaire par des protéines et efflux actif par des transporteurs

assurant l'export. Ces mécanismes sont coordonnés au niveau transcriptionnel par des réseaux de régulateurs dépendants des senseurs qui reconnaissent la présence d'une quantité excessive de métaux toxiques. [17, 19]

Nous avons présenté plus haut les résultats des études portant sur les adaptations d'*E. coli* à des quantités excédentaires de Zn^{2+} . [155-157, 159] Plusieurs de ces adaptations sont directement liées aux mécanismes de résistance à la toxicité de Zn^{2+} . Nous allons maintenant nous intéresser de plus près aux transporteurs responsables de l'efflux de Zn^{2+} et à la régulation de ceux-ci.

III n Transporteurs d'efflux de Zn^{2+} :

Plusieurs transporteurs impliqués dans l'efflux de Zn^{2+} sont utilisés par *E. coli*. Il s'agit de l'ATP-ase de type P d'efflux de métaux ZntA, le transporteur CDF ZitB, le transporteur CDF YiiP et possiblement la pompe RND à composantes multiples CusCFBA. [189-192] Aucun de ces systèmes n'est strictement spécifique au Zn^{2+} , l'éventail des ions transportés par chacun d'eux est plus large et inclut d'autres ions métalliques tels que Cd^{2+} (ZntA, ZitB, YiiP), Co^{2+} (ZntA), Pb^{2+} (ZntA), Cu^+ , Ag^+ (CusFCBA). ZntA est le transporteur dont l'implication dans la résistance au Zn^{2+} excédentaire ainsi que l'induction en présence de Zn^{2+} excédentaire, ont été directement démontrées. Pour les autres transporteurs, les données sont partielles. Le transport de Zn^{2+} par ZitB et YiiP a été expérimentalement démontré, mais l'induction de ces transporteurs lors de la réponse à une quantité excédentaire de Zn^{2+} n'a pas été faite. Dans le cas de CusFCBA, l'induction en présence de quantités excédentaires de Zn^{2+} a été démontrée, mais non le transport de Zn^{2+} . Étant donné que l'expression de ZntA semble suffire à protéger la cellule d'*E. coli* de la toxicité du Zn^{2+} et que la perte de fonction de ce transporteur suffit à rendre le mutant sensible à cette toxicité, nous allons décrire ZntA plus en détail. [189]

III o ZntA fonctionnement et régulation:

ZntA est une P-ATPase d'efflux, le transport des ions par ce transporteur est donc énergisé par l'hydrolyse de l'ATP. ZntA permet d'expulser le Zn^{2+} du cytoplasme vers le périplasma à travers la membrane interne. L'architecture de la protéine se compose de huit domaines intramembranaires ainsi que des domaines cytoplasmiques suivants : domaine de liaison du métal en région N-terminale (aussi nommé domaine CPC à cause d'un motif conservé caractéristique), d'un domaine phosphatase qui comporte le tunnel central de passage du métal exporté et d'un large domaine aspartyl-kinase en région C-terminale de la protéine.

La première étape de transport implique en région N-terminale, la liaison tétraédrique de Zn^{2+} au niveau du motif GMDCAAC par les deux cystéines et un aspartate. Le transport implique le transfert du phosphate γ de l'ATP par l'aspartyl-kinase vers un résidu aspartyl conservé dans le huitième domaine transmembranaire, avec formation d'un résidu phosphorylé. Cette étape est suivie de réarrangements de la conformation qui provoquent le passage de l'ion métallique à des cystéines localisées dans le sixième domaine transmembranaire, au niveau du motif CPC proche de la face périplasmique de la membrane externe. La liaison des ions des divers métaux transportés par ZntA se fait avec une coordination différente, mais aux mêmes deux sites du domaine N-terminal et du sixième domaine transmembranaire. Enfin, les mutations au niveau du site de liaison N-terminal n'abolissent pas le transport mais diminuent grandement sa vitesse. [19, 193]

La protéine régulatrice ZntR est directement responsable de la régulation transcriptionnelle de l'expression de l'opéron *zntA*. ZntR appartient à la famille des régulateurs de type MerR, dont les membres régulent les gènes de réponse aux stressés causés par des antibiotiques, le stress oxydatif et différents métaux toxiques (par exemple MerR régule la transcription des gènes d'export du mercure) chez différentes espèces bactériennes. [194] Des études consacrées à l'affinité et au mécanisme d'action de ZntR ont montré que ZntR est activée par la liaison de Zn^{2+} à son domaine C-terminal, lorsque la concentration de Zn^{2+} dans l'environnement atteint environ $11.5 (\pm 1.3) \times 10^{-16}$ M, alors que Zur est activé par une concentration de $2.0 (\pm 0.1) \times 10^{-16}$ M. L'affinité de Zur pour Zn^{2+} est donc environ six fois supérieure à celle de ZntR. Ceci correspond à des données expérimentales qui suggèrent que la transcription de *znuC* est réprimée par Zur avant que la transcription de *zntA* ne soit induite par ZntR. Il est de plus clair que les deux protéines seraient saturées de Zn^{2+} à une concentration de 10^{-15} M, ce qui en prenant en considération le faible volume d'une cellule bactérienne, se révèle être inférieur à un ion de Zn^{2+} par cellule d'*E. coli*. Ces données semblent confirmer que le Zn^{2+} n'est jamais libre dans le cytoplasme, mais est toujours lié à des métalloprotéines. [22] Le mécanisme d'action de ZntR implique l'interaction de la région N-terminale de la protéine, contenant un motif hélice-tour-hélice, avec une séquence palindromique conservée. ZntR chargé de Zn^{2+} va provoquer une distorsion au niveau de la structure locale de l'ADN, rendant le promoteur plus apte à recevoir le complexe ARN-polymérase. [195, 196]

Il est donc apparent que la quantité de Zn^{2+} cellulaire, ainsi que son état de liaison aux diverses métalloprotéines Zn^{2+} -dépendantes, sont strictement régulés dans les cellules bactériennes. La situation du Zn^{2+} chez les procaryotes est sur ce point similaire à ce que nous avons décrit précédemment concernant les cellules eucaryotes. Zn^{2+} est essentiel, mais sa toxicité potentielle est soigneusement gérée par un ensemble de mécanismes cellulaires.

Étant donné l'importance accordée à Zn^{2+} par les eucaryotes et les procaryotes, étant donné aussi le contrôle stricte de la disponibilité de cet ion dans la cellule bactérienne, autant que dans les cellules, tissus et fluides de l'organisme hôte, l'acquisition de Zn^{2+} devrait être un enjeu important lors du processus infectieux.

III p Importance du Zn^{2+} lors de l'infection bactérienne :

Plusieurs études ont démontré que la perte du fonctionnement des transporteurs homologues à ZnuACB, chez différentes espèces bactériennes pathogènes examinées, affectait la virulence. [55, 57, 197-200] Ça a été le cas chez *Haemophilus ducreyi*, *Salmonella enterica* ser. Typhimurium, *Pasteurella multocida* et *Brucella abortus*. Dans toutes ces études la croissance des mutants Δznu était affectée en milieu pauvre en Zn^{2+} .

Dans le cas de *H. ducreyi*, le défaut de croissance en milieu pauvre en Zn^{2+} et l'atténuation de la virulence dans le modèle expérimental de chancre chez le lapin, ont été complétés en *trans* par l'ajout d'un *znuA* fonctionnel. [199]

Dans le cas de *S. enterica* Typhimurium, deux études indépendantes réalisées avec d'une part un mutant $\Delta znuC$ et d'autre part avec un mutant $\Delta znuA$ ont montré une atténuation dans le modèle expérimental murin lors d'une inoculation intrapéritonéale et orale. [55, 57] De plus, une de ces études a démontré que le mutant $\Delta znuA$ était incapable de croître dans les cellules épithéliales de la lignée Caco-2 et avait une croissance moindre dans les macrophages quand il avait été préalablement cultivé dans un milieu pauvre en Zn^{2+} . Enfin, lors de cette même étude, il a été démontré que *znuA* est induit lorsque les cellules bactériennes infectent les cellules et cela même si le milieu intracellulaire était riche en Zn^{2+} . [55] Par contre, les mutations $\Delta znuA$ et $\Delta znuC$ n'ont pas été complétées lors de ces deux études.

Chez *B. abortus*, la mutation $\Delta znuA$ atténuait la virulence dans le modèle expérimental murin et affectait la capacité des bactéries de survivre à l'intérieur des cellules HeLa et des macrophages murins. De plus, dans ce même modèle expérimental une souche mutante $\Delta znuA$ a été utilisée avec succès en tant que vaccin vivant atténué. [198, 200]

Chez *P. multocida*, les mutations $\Delta znuA$ et $\Delta znuCB$ atténuaient la virulence dans le modèle expérimental murin. Chez cette bactérie les opérons *znuA* et *znuCB* ne sont pas localisés à proximité l'un de l'autre. De plus, leur transcription est bien dépendante du niveau de Zn^{2+} présent dans le milieu, mais n'est pas sous le contrôle de Zur. Les deux opérons sont régulés par le répresseur de transport de fer Fur qui est aussi une métalloprotéine Zn^{2+} -dépendante. [197]

Toutes ces études démontrent que Zn^{2+} est important pour la virulence de bactéries très distantes génétiquement, causant des infections dissemblables et infectant des hôtes différents. Ces résultats suggèrent que le transport de Zn^{2+} peut être important pour la virulence des microorganismes qui nous intéressent dans le cadre de notre étude : les souches extra-intestinales d'*E. coli* (ExPEC). De plus, le rôle de ZupT, le second transporteur de Zn^{2+} , dans la virulence n'a pas été investigué à ce jour. Nous avons donc pris la décision d'étudier l'importance du transport de Zn^{2+} par les deux transporteurs ZnuACB et ZupT pour la virulence de deux souches ExPEC : uropathogène humaine CFT073 et pathogène aviaire χ 7122 dans le modèle murin et aviaire respectivement.

IV Le fer

IV a Caractéristiques physico-chimiques du fer :

Le fer (Fe), dont le numéro atomique est 26 et la masse atomique de 55,845 Da est un élément du groupe 8, de la période 4 et du bloc d du tableau périodique des éléments. Le rayon atomique du fer est de 140 pm. Sa structure électronique contient une couche électronique *d* contenant 6 électrons et une couche *s* contenant 2 électrons. Le fer peut adopter plusieurs états d'oxydation en perdant 1, 2, 3, 4, 5, ou 6 électrons, les états d'oxydation les plus stables étant Fe^{2+} et Fe^{3+} . Le fer peut aussi changer de spin en fonction de son environnement. Le fer est très abondant dans la croûte terrestre dont il est le quatrième élément en abondance. Mais en présence de l'oxygène le fer change son état d'oxydation de Fe^{2+} à Fe^{3+} , formant avec des molécules d'eau des complexes tels que $[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_3(\text{OH})_3]$, qui sont quasiment insolubles et donc difficilement accessibles pour les organismes vivants. C'est pour cela que la disponibilité du fer pour les différents organismes vivants reste globalement faible, surtout dans les milieux aérobies. Malgré cette faible disponibilité en milieu aérobie, le fer a été adopté par la majorité des organismes vivants en tant qu'élément important de la physiologie cellulaire. En effet, grâce à sa capacité de changer d'état d'oxydation, le fer est utilisé en tant qu'accepteur ou donneur d'électrons dans de nombreux processus métaboliques. La capacité du fer de changer de spin peut aussi permettre à ce métal de s'adapter à de nombreux ligands protéiques. Le fer est donc un composant essentiel de nombreuses métalloprotéines et métallo-enzymes qui sont indispensables dans la majorité des organismes vivants. Mais tout en étant indispensable, le fer est aussi hautement toxique, car il contribue à la génération du stress oxydatif par l'intermédiaire des réactions connues sous le nom des réactions de la chimie de Fenton. [16, 201]

IV b Le fer dans la biologie:

Le fer joue un rôle important dans la physiologie cellulaire, autant chez les procaryotes que les eucaryotes. Le fer participe, en tant que cofacteur enzymatique, au processus aussi importants et divers que la respiration, la photosynthèse, la fixation de l'azote inorganique, la méthanogenèse, la production et consommation de l'hydrogène, le cycle des acides tricarboxyliques (cycle de Krebs), le transport d'oxygène, la synthèse de l'ADN et la régulation de l'expression de l'information génétique. [16]

Selon une classification simplifiée des sites liant le fer au sein du métallome cellulaire, ce métal fait partie du site prosthétique de trois différentes classes de métalloprotéines; les protéines comprenant un groupement hème, les protéines fer-soufre (Fe-S) et les protéines non-hème / non Fe-S. Les métalloprotéines à groupement hème participent au transport des électrons (cytochromes), à l'activation de l'oxygène (cytochrome-oxydases) et la réduction du H_2O_2 (catalases et peroxydases). Les protéines Fe-S interviennent aussi dans le transport des électrons (ferredoxine), dans la synthèse des acides

aminés (glutamate synthétase), le cycle de Krebs (aconitase, succinate-déhydrogénase) et la synthèse de la pyrimidine (dihydroorotate-déhydrogénase). Enfin, les protéines non hème / non Fe-S permettent la synthèse des acides aromatiques (l'acide 3-deoxy-D-arabinoheptulosonique 7-phosphate synthétase) et la neutralisation des radicaux réactifs de l'oxygène (superoxyde-dismutase FeSOD et catalase). [81]

La contribution du fer à ces activités catalytiques est possible, car le fer forme facilement des liaisons de coordination avec des ligands comportant des groupements oxygénés, soufrés et azotés. En tant que cofacteur catalytique le fer subira des transferts d'électrons. Par conséquent, en fonction de l'environnement protéique qui entoure le site réactif de la métallo-enzyme, le fer coordonné pourrait adopter des potentiels Redox Fe(III)/Fe(II) et changer de potentiel Redox en acceptant ou en cédant des électrons. [16]

C'est aussi grâce à ce potentiel réactif que les cations libres du fer peuvent contribuer aux réactions de Fenton. Ces réactions génèrent, lors de l'interaction avec l'oxygène, des oxydants tels que l'anion superoxyde (O_2^-) et le peroxyde (H_2O_2), en produisant des radicaux hydroxyles dommageables pour la cellule selon l'équation $[Fe^{2+} + H_2O_2 \rightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH^\cdot]$. Les radicaux hydroxyle attaquent les protéines en les dénaturant, les acides nucléiques en provoquant des mutations et causent des réactions de peroxydation en chaîne des lipides en détruisant les membranes cellulaires. Cette action oxydante extrême des sous-produits de l'interaction du fer avec l'oxygène, est à l'origine de la toxicité de ce métal. D'où la nécessité d'un contrôle strict de la quantité de fer disponible au niveau cellulaire. Ce contrôle s'exerce au niveau du transport du fer et s'accompagne d'une mise en réserve sécuritaire du fer cellulaire sous forme liée aux diverses métalloprotéines. [16, 201]

IV c Le fer chez l'hôte:

Chez l'humain, le fer absorbé quotidiennement, est utilisé à 80% pour la production de quelques 200 milliards d'érythrocytes qui contiennent l'hémoglobine dont le groupement hème contient du fer. De plus, comme nous l'avons mentionné plus haut, les 20% du fer restant sont aussi importants pour accomplir plusieurs fonctions vitales dans d'autres types cellulaires. Il n'est donc pas étonnant qu'un manque de fer empêche un fonctionnement cellulaire normal et soit par conséquent nuisible à la santé. Étant donné la toxicité du fer, les besoins en fer sont constamment contrebalancés par le risque du stress oxydatif. C'est pour cela que chez l'humain, comme chez les autres eucaryotes supérieurs, il existe un réseau complexe de ligands, de récepteurs et de transporteurs de fer, dont la production est coordonnée par des régulateurs transcriptionnels au niveau cellulaire et dont la fonction est intégrée grâce à un contrôle hormonal au niveau de l'organisme. Ce contrôle permet d'ajuster le niveau du fer

disponible, afin de le rendre optimal pour un stade physiologique de l'organisme, un tissu ou un groupe particulier de cellules. De plus, une des caractéristiques de l'homéostasie du fer chez les eucaryotes supérieurs est la forte implication du système immunitaire dans la gestion de la disponibilité du fer. [202]

IV d Transporteurs eucaryotes du fer:

Le fer utilisé par notre organisme provient de notre diète et est absorbé au niveau intestinal par le transporteur DMT-1 (aussi nommé DCT-1 ou Nramp 2). Le Fe^{3+} qui se trouve dans le lumen intestinal sera réduit en Fe^{2+} par la ferriréductase Dcytb. Après absorption par les entérocytes, le Fe^{2+} sera exporté vers le flux sanguin par le transporteur responsable de l'export cellulaire du fer : le ferroportin. Le fer exporté sous la forme de Fe^{2+} sera oxydé en Fe^{3+} par l'une des deux ferrioxidasés : céruloplasmine ou hephaéstine. Le Fe^{3+} sera alors complexé et donc solubilisé par le ligand protéique responsable de la prise en charge du fer plasmatique : la transferrine (Tf). [202]

La transferrine va transporter deux ions de Fe^{3+} (TfFe) jusqu'aux cellules qui expriment un des deux récepteurs de transferrine : TfR-1 ou TfR-2. Le récepteur TfR-1 est le récepteur général ubiquitaire présent sur tous les types cellulaires, alors que TfR-2, qui a une affinité moindre pour TfFe, est exprimé sur certains types cellulaires seulement dans des tissus particuliers (foie, duodénum). Le mécanisme d'import de TfFe captée par Tfr implique la colocalisation du complexe récepteur-ligand vers des vésicules tapissées de clathrine qui subiront une endocytose. Ces vésicules deviennent des phagosomes qui sont par la suite acidifiés provoquant la libération de Fe^{3+} de Tf. Une ferriréductase non identifiée réduit le Fe^{3+} en Fe^{2+} qui sera pompé à l'extérieur du phagosome vers le cytoplasme par Nramp 2 (DMT-1), le même transporteur qui permet l'internalisation du fer intestinal. Nramp-2 est un symporteur des cations divalents des métaux de transition (Fe, Mn, Zn), dépendant des protons et l'acidification du phagosome permet son fonctionnement. Tf et TfR sont recyclés vers la surface et peuvent être réutilisés. Outre ce schéma global de transport de TfFe, il existe des spécialisations tissulaires locales dans la capture de TfFe, par exemple le cubulin est le récepteur qui capte TfFe dans les cellules rénales. De plus, le fer peut aussi être absorbé par les cellules grâce à des mécanismes Tf-indépendants. Outre le DMT-1 que nous avons déjà décrit, les canaux de calcium cellulaires peuvent dans certaines circonstances permettre l'entrée du fer, le fer peut aussi être capté sous la forme de l'hémoglobine liée par l'haptoglobine : une protéine de la phase aiguë de l'inflammation. Mais plus intéressant encore est le mécanisme d'internalisation du fer chélaté par la protéine NGAL24/p32 (*Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin*). [202]

Cette protéine est excrétée par les neutrophiles, produite de façon constitutive par les myélocytes et aussi sous certaines conditions par le foie, les cellules intestinales, les cellules caliciformes de la trachée et les cellules rénales. NGAL appartient à la famille protéique étendue des lipocalines qui sont des protéines capables de lier et de transporter de nombreux composés chimiques diversifiés (nous avons mentionné précédemment la lipocaline bactérienne YodA (ZinT) qui est impliquée dans l'homéostasie du zinc). NGAL est capable de lier les complexes sidérophore-fer (chélateurs de fer de faible poids moléculaire liant Fe^{3+} : Sdp-Fe) avec une affinité d'environ 0,4 nM. Le complexe NGAL-(Sdp-Fe) est internalisé dans les cellules grâce à l'existence des récepteurs cellulaires, dont un a été identifié en tant que récepteur de récupération (*scavenger*) nommé mégalin. Le fer contenu dans le sidérophore est libéré après endocytose du complexe NGAL-Sdp-Fe vers les phagosomes tardifs, le fer sera utilisé alors que NGAL est probablement recyclé. Étant donné que NGAL est exprimé par les neutrophiles et les cellules des tissus blessés, il fait partie de l'immunité innée. NGAL capte le sidérophore entérobactine d'*E. coli* et est bactériostatique, c'est donc une autre protéine impliquée dans la privation des pathogènes en métaux. [203]

Le transporteur principal du fer chez les eucaryotes Nramp-2 (DMT-1) appartient à la famille des transporteurs Nramp (*Natural resistance associated macrophage protein*), une famille étendue de transporteurs de cations métalliques présents chez les eucaryotes et les procaryotes. [204] L'homologue de Nramp-2, Nramp-1 est exprimé dans les phagosomes des phagocytes et contribue à les appauvrir en métaux, qui autrement seraient disponibles aux microorganismes phagocytés. Nramp-1 a été identifié en tant qu'élément important de l'immunité innée. En absence de Nramp-1, les souris mutantes sont nettement plus susceptibles à plusieurs pathogènes qui infectent les phagocytes. [205] D'autre part, les bactéries contiennent aussi leur homologue d'Nramp-1 : MntH qui est surtout impliqué dans l'import du manganèse, mais a aussi une affinité plus faible pour le fer. [206, 207]

Comme nous l'avons déjà indiqué, le transport dépendant de Tf implique des récepteurs tels que TfR-1 et TfR-2 ou encore le cubulin qui permettent l'endocytose des complexes Tf-Fe-récepteur. Par la suite, le fer libéré dans le phagosome est transporté dans le cytoplasme par Nramp-2. [202]

Le transport de l'hème implique la capture du complexe de celui-ci avec l'haptoglobine par le récepteur CD163 suivi d'une endocytose. Ce transport est important car il permet aux macrophages de recycler l'hème provenant des érythrocytes sénescents. Cet hème recyclé forme la majeure partie du fer utilisé quotidiennement par notre organisme : env. 25 mg en moyenne, contre 3 mg provenant de l'absorption intestinale du fer alimentaire. [202] Les cellules immunitaires contrôlent donc la récupération de la majeure partie du fer utilisé par notre organisme.

Le transport de NGAL-Sdp-Fe est accompli par une endocytose dépendante du mégalin, suivie de la libération du fer et du transport de celui-ci par Nramp-2. Nramp-2 est donc un transporteur central, au niveau duquel sont intégrés divers sentiers d'acquisition du fer par les cellules eucaryotes.

Certains transporteurs importants pour l'import d'autres métaux ont aussi été impliqués dans l'import du fer par les cellules eucaryotes. Il en est ainsi du transporteur Zip-14 impliqué dans l'import de Zn^{2+} dans les hépatocytes suite à une stimulation par IL-6. [44, 208] Zip-14 appartient à la famille des transporteurs Zip (*ZRT-IRT like protein*) aussi appelée SLC39 (*Solute-Linked-Carrier*), une famille de transporteurs des cations divalents des métaux de transition retrouvée chez les eucaryotes et les procaryotes (nous avons évoqué les transporteurs Zip dans la partie portant sur le zinc). [128]

Enfin, le seul transporteur actuellement connu et chargé de l'export du fer de la cellule est le ferroportin. Ce transporteur appartenant à la famille SLC40, dont il est d'ailleurs le seul membre, est important pour le recyclage du fer provenant de l'hémoglobine endocytée par les macrophages. Par conséquent, le ferroportin participe au métabolisme de la majeure partie du fer utilisé quotidiennement par le corps humain. [209]

IV e Entreposage du fer chez les eucaryotes :

L'entreposage du fer chez les eucaryotes se fait par le biais d'une protéine oligomérique de 24 sous unités : la ferritine. La ferritine est une protéine sphérique constituée des chaînes peptidiques lourdes H et légères L dont le ratio varie d'un organe à l'autre. La ferritine a des propriétés enzymatiques de ferorréductase, ce qui lui permet de transformer le Fe^{2+} importé en Fe^{3+} . L'intérieur de la ferritine est creux et peut contenir jusqu'à 4500 atomes de fer sous la forme d'ions Fe^{3+} liés par des ponts oxy et hydroxy et organisés en une grille cristalline. Un type particulier de ferritine est l'homopolymère des sous unités H exprimé dans les mitochondries (MtF). La libération du fer à partir de la ferritine se fait grâce à sa dégradation. [201] Il existe aussi des homologues bactériens de la ferritine. [16] Chez les mammifères l'organe principal de l'entreposage du fer est le foie, bien que ce soit la moelle osseuse, où sont générées les cellules sanguines, qui soit le principal organe utilisateur du fer. [202]

IV f Homéostasie eucaryote du fer :

Chez les eucaryotes supérieurs on peut distinguer deux types de régulation de l'homéostasie du fer : extracellulaire et intracellulaire. La régulation extracellulaire est humorale et systémique, le rôle central y est joué par un peptide de 25 résidus : l'hepcidin (aussi nommé LEAP-1). Le précurseur d'hepcidin (LEAP-2), d'une taille de 77 résidus, est excrété par le foie sous la forme inactive et sera

activé par clivage enzymatique en libérant un peptide riche en cystéines formant quatre ponts disulfide. Il est à noter que les cystéines interviennent fréquemment dans la chélation des divers ions métalliques par les métalloprotéines. L'hepcidin est doté d'une activité antimicrobienne et a des caractéristiques structurales en région C-terminale qui le rapprochent des défensines. [210-212] L'hepcidin est sécrété par le foie quand la quantité du fer plasmatique devient trop élevée. La sécrétion d'hepcidin est aussi augmentée dans le cas d'inflammation et diminuée dans le cas d'hypoxie et d'anémie. L'hepcidin diminue le fer disponible en réduisant l'absorption intestinale du fer, la libération du fer stocké dans le foie et la sécrétion par les macrophages du fer recyclé à partir des groupements hème des érythrocytes sénescents. L'hepcidin agit sur le ferroportin. [213]

La régulation intracellulaire comporte deux volets : la régulation transcriptionnelle et la régulation post-transcriptionnelle. La régulation transcriptionnelle dépend de nombreux régulateurs tels que le facteur inductible par l'hypoxie (HIF pour *hypoxia inducible factor*) et certaines cytokines (TNF- α , INF- γ , IL-1, IL-6). [202]

La régulation dépendante de l'HIF est connectée à celle exercée par l'hepcidin, puisque la sécrétion de ce peptide hormonal diminue lors de l'hypoxie. La régulation par l'HIF répond aussi à la présence des bactéries ou de leurs produits tels que le LPS. [214, 215] De plus, l'HIF affecte directement la transcription des gènes qui encodent Nramp-2 (DMT-1) et TfR. La régulation transcriptionnelles des gènes impliqués dans l'homéostasie du fer est encore insuffisamment bien caractérisée. Par contre, la partie post-transcriptionnelle de la régulation, impliquant les protéines régulatrices du fer (IRP pour *iron regulatory protein*) est assez bien documentée. [202]

Il existe deux isoformes d'IRPs : IRP-1 et IRP-2. Ces deux protéines vont se fixer à des séquences conservées nommées IRE (pour *iron regulatory sequence*) contenues dans la partie non-codante de l'ARNm des gènes encodant les protéines impliquées dans le métabolisme du fer. Si l'IRE se trouve en 5' de l'ARNm, la fixation des IRPs inhibe la traduction de l'ARNm en protéines. Par contre, dans certains cas l'ARNm contient de multiples IREs en 3' de la séquence codante et la fixation des IRPs à ce niveau va stabiliser l'ARNm et donc lui permettre d'être plus traduit en protéine. Les IRPs sont des senseurs de fer, leur mode d'activation/inactivation diffère, mais le résultat en est le même : quand le fer manque les IRPs sont activées, quand le fer est surabondant les IRPs sont inactivées. IRP-1 est une protéine Fe-S, quand le fer manque l'amas Fe-S n'est pas formé, ce qui libère le site de fixation de l'IRP-1 aux IRE. Quand le fer est abondant, l'amas Fe-S est formé et IRP-1 perd sa capacité de lier l'ARNm en devenant une aconitase cytoplasmique. IRP-2 quant à elle est tout simplement dégradée quand le fer devient abondant. [202]

IV g Le fer et l'immunité:

Comme nous l'avons noté plus haut, les cellules immunitaires, les cytokines qu'elles produisent et des molécules produites lors du processus inflammatoire sont directement impliqués dans l'homéostasie du fer. Ainsi, la majeure partie du fer plasmatique provient du recyclage des érythrocytes sénescents par les macrophages, les interleukines influencent la transcription des gènes encodant diverses protéines impliquées dans le transport et le stockage du fer, les neutrophiles sécrètent NGAL qui est dotée de propriétés bactériostatiques et l'hepcidin qui est l'hormone centrale du métabolisme du fer est dotée de propriétés bactéricides. Il est à noter que certaines fonctions impliquées dans l'homéostasie du fer sont modulées par la reconnaissance des composantes bactériennes (surtout le LPS) par les récepteurs TLR (*Toll-like receptors*). [214, 216] De plus, Nramp-1 est directement impliqué dans la déplétion des ions métalliques du phagosome des phagocytes. [205] On pourrait ajouter à cela que l'haptoglobine qui lie l'hème présent dans le plasma, est plus sécrétée durant la phase aiguë de l'inflammation et qu'il en va de même pour la céruloplasmine qui est importante pour oxyder le Fe^{2+} en Fe^{3+} . [217]

L'action des différents facteurs liés à l'immunité entraîne une hypoferremie (diminution du fer plasmatique) et un accroissement du stockage du fer dans le foie. Globalement cette diminution du fer disponible contribue à freiner la croissance des populations des microorganismes pathogènes infectieux. En effet, ces microorganismes ont aussi (en majorité) besoin du fer pour survivre et se développer. Il en résulte une compétition pour le fer entre l'organisme hôte et les microorganismes pathogènes. Pour obtenir le fer nécessaire, les bactéries ont donc développé de nombreux systèmes de transport de fer, dont certains sont particuliers aux souches virulentes. [16, 43]

IV h Le fer chez les bactéries :

Le fer remplit de nombreuses fonctions vitales dans les cellules bactériennes. La majorité de ces fonctions ont des homologues eucaryotes, par exemple le fer intervient dans le transfert des électrons dans la chaîne respiratoire des eucaryotes et procaryotes et il en va de même de la synthèse de l'ADN et de l'ARN ou encore des enzymes du métabolisme des sucres impliquées dans le cycle de Krebs. Le fer est donc absolument nécessaire à la vie cellulaire de presque toutes les espèces bactériennes (à l'exception des bactéries pathogènes humaines telles que *Borrelia burgdorferi* ou *Treponema pallidum* et des bactéries lactiques telles que *Lactococcus plantarum* qui remplacent le fer par le manganèse et le cuivre) et les diverses bactéries se doivent d'avoir des systèmes efficaces d'acquisition du fer. Cette nécessité est encore plus élevée en ce qui concerne les bactéries pathogènes, car dans l'organisme hôte le fer est limité par des mécanismes spécifiques liés à l'immunité. [16, 202]

IV i Transporteurs bactériens du fer :

Chez *E. coli* il existe cinq systèmes bien documentés de transport de fer de haute affinité, ainsi que d'autres d'affinité moindre. Globalement nous pouvons subdiviser les systèmes de haute affinité en deux groupes : ceux qui permettent le transport de Fe^{3+} et ceux qui transportent Fe^{2+} . Le premier groupe comprendrait les systèmes responsables de la production et sécrétion des sidérophores, ainsi que de la récupération des complexes formés par ces sidérophores et l'ion Fe^{3+} . Le second groupe comprend FeoABC et SitABCD. En ce qui concerne les transporteurs de faible affinité, ils comprennent l'homologue de Nramp-1 eucaryote MntH qui est avant tout un transporteur de Mn^{2+} , le transporteur des phosphates inorganiques Pit, qui permet l'entrée des phosphates complexant des ions métalliques (dont le fer), le transporteur de zinc ZupT qui permet aussi l'import du fer et du manganèse et un transporteur de découverte récente qui est le transporteur de fer ferreux EfeUOB. De plus, il existe au moins un transporteur connu responsable de l'efflux du fer de la cellule bactérienne. Il s'agit de FieF appartenant à la famille des transporteurs CDF (pour *cation diffusion facilitator*). FieF n'est pas strictement spécifiques du fer, puisqu'il semble aussi pouvoir transporter le zinc. [218]

IV j Entrée du fer dans la cellule bactérienne :

Le fer ferreux (Fe^{2+}) entre par diffusion à travers les porines de la paroi cellulaire dans le périplasma des cellules Gram négatives. Ce n'est pas le cas du fer ferrique (Fe^{3+}) qui en raison de sa très faible solubilité a besoin de chélateurs spécifiques pour être solubilisé et des récepteurs spécifiques pour être transporté à l'intérieur de la cellule. Ces chélateurs de faible poids moléculaire sont nommés sidérophores. [16]

IV k Les sidérophores :

Les systèmes dépendants des sidérophores sont nommés en fonction de ces chélateurs de faible poids moléculaire qui ont une haute affinité pour l'ion Fe^{3+} . Les sidérophores produits par différents microorganismes sont très nombreux, on connaît actuellement plus d'une centaine de sidérophores produits par les bactéries et les champignons différents. Tous les sidérophores peuvent être globalement subdivisés en cathécolates et hydroxamates selon leur structure chimique. Les sidérophores accomplissent trois rôles : ils permettent de solubiliser le Fe^{3+} sous forme de chélates, lors d'infection ils permettent aux bactéries pathogènes de subtiliser le fer des protéines de l'hôte et dans le cas de compétition dans une population hétérogène de microorganismes ils réservent le fer chélaté à leur microorganisme producteur. Ce dernier rôle n'est rempli que partiellement car certains microorganismes possèdent des récepteurs pour des sidérophores qu'ils ne produisent pas, ce qui leur

permet de s'approprier une partie plus importante de fer disponible dans une niche environnementale donnée. [81]

En ce qui concerne *E. coli*, la production de l'entérobactine (aussi appelée entérochéline) a été démontrée pour l'ensemble des souches sauvages, certaines souches pathogènes produisent l'aérobactine (généralement encodée par un opéron plasmidique ou chromosomique faisant partie d'un îlot de pathogénicité) et la yersiniabactine (encodée sur un îlot de pathogénicité), de même que les salmochélines qui sont des dérivées de l'entérobactine glycosylée par le système Iro. De plus, *E. coli* produit des récepteurs pour des sidérophores fongiques tels que le ferrichrome, le coprogène, et l'acide rhodotorulique qu'elle récupère dans des milieux qu'elle partage avec les microorganismes producteurs. D'autres substances telles que le citrate, les groupements hème, de même que l'acide dihydroxybenzoïque (DHB) et la dihydroxybenzoylsérine (DHBS), qui sont des sous-produits de la synthèse de l'entérobactine, permettent aussi de solubiliser Fe^{3+} et sont récupérés par des systèmes récepteur-transporteur qui leurs sont dévoués. Le transport des sidérophores est actif et utilise le système TonB-ExbB/ExbD, trois protéines indispensables pour fournir l'énergie nécessaire au passage des complexes sidérophore-fer à travers la membrane externe. Enfin, les récepteurs de sidérophores servent aussi de portes d'entrée aux colicines et aux phages. [16]

L'entérobactine est le sidérophore principal d'*E. coli* produit par toutes les souches de cette espèce. L'entérobactine appartient au groupe des cathécholates et est le résultat de plusieurs étapes de synthèse qui en partant de l'acide chorismique aboutissent au sidérophore grâce à l'aide de six enzymes encodés par les gènes *ent*. De plus, les gènes *fep* responsables du transport du sidérophore et du complexe sidérophore-fer sont au nombre de cinq, dont le récepteur FepA. Enfin, le gène *fes* est responsable de la libération du fer du complexe chélaté. Le processus de production de l'entérobactine peut-être subdivisé en deux grandes étapes : la conversion du chorismate en DHB (dihydroxybenzoyl) et la synthèse subséquente de l'entérobactine à partir de DHB et de la sérine en passant par le DHBS (dihydroxybenzoylsérine). Le produit final est sécrété dans le périplasme par l'intermédiaire d'*entS* (*ybdA*) puis passe la membrane externe par la porine TolC. Il est à noter que malgré son affinité très élevée pour le Fe^{3+} , l'entérobactine ne semble pas améliorer l'acquisition du fer par les souches pathogènes d'*E. coli* à l'intérieur de l'organisme hôte. Le fait est, que l'entérobactine est captée par NGAL, qui la soustrait ainsi aux récepteurs bactériens et détourne le fer capté par l'entérobactine vers les cellules de l'hôte. [16, 219]

L'aérobactine est un sidérophore appartenant au group des hydroxamates. Il est surtout produit par des souches virulentes d'*E. coli* et plus particulièrement les souches Gram positives et extra-intestinales, ainsi que par d'autres entérobactéries pathogènes (*Yersinia*, *Shigella*). L'aérobactine

contribue à la virulence des souches productrices, on la considère donc comme un facteur de virulence potentiel. Il est à noter que contrairement à l'entérobactine, l'aérobactine n'est pas liée par NGAL et peut donc être utilisée par les souches virulentes afin d'obtenir le fer à l'intérieur de l'organisme hôte. L'affinité de l'aérobactine permet d'ailleurs de prélever le fer lié à la transferrine. L'aérobactine est synthétisée par quatre gènes *iuc* à partir de la lysine et du citrate et récupérée par le récepteur IutA. L'opéron aérobactine est le plus souvent porté par de larges plasmides de virulence de la famille pColV, qui permettent aussi la synthèse de la colicine V, mais peut aussi être intégré dans le chromosome. [220]

La yersiniabactine est un sidérophore dont la formule est un hybride de cathécolate et d'hydroxamate. Ce sidérophore est considéré en tant que facteur de virulence car il fait partie de l'îlot de haute pathogénicité HPI (pour *high pathogenicity island*) de l'espèce *Yersinia* comprenant les pathogènes responsables de la peste ainsi que d'autres infections importantes chez l'humain. HPI est aussi présent chez d'autres entérobactéries pathogènes et la yersiniabactine est aussi produite par certaines souches ExPEC. Sa synthèse implique en tout six enzymes encodées par des gènes *ybt* ainsi que deux synthétases, une non-ribosomale de peptides et une de polykétides, encodées par deux gènes *irp*. Son transport fait intervenir le récepteur de membrane externe encodé par le gène *psn*, ainsi qu'un transporteur de type ABC, encodé par deux gènes *ybt* supplémentaires pour traverser le périplasma et la membrane périplasmique. Un régulateur transcriptionnel de la production de la yersiniabactine est synthétisé par le gène *ybtA*. [221, 222]

Le dernier type de sidérophore d'*E. coli* est de découverte récente, les salmochélines sont produites par glycosylation des constituants de la synthèse de l'entérobactine, plus particulièrement de la dihydroxybenzoïlsérine (DHBS) et sont en fait un ensemble de produits dérivés de l'assemblage de DHBS et glycosylés. La synthèse des salmochélines fait intervenir les gènes *ent* responsables de la production de l'entérobactine ainsi que les gènes *iro* responsables de la glycosylation, de la sécrétion et du transport des produits glycosylés. Les salmochélines sont produites par certaines souches virulentes d'*E. coli* ainsi que par *Salmonella*. La production des salmochélines est un facteur de virulence. À la différence de l'entérobactine, les salmochélines ne sont pas liées par NGAL (sidéocalin) car la liaison à NGAL est empêchée par la présence des résidus de glucose attachés au sidérophore. Les salmochélines peuvent donc capter le fer disponible dans le milieu interne de l'organisme hôte et le livrer à la bactérie productrice en contournant ce mécanisme de l'immunité innée. [79, 223-225]

Finalement, des molécules autres que des sidérophores permettent de solubiliser l'ion ferrique et sont récupérées dans le milieu par des récepteurs spécifiques. Ainsi, le complexe citrate-2[Fe³⁺] est récupéré par le récepteur FecA, qui peut aussi lier le complexe entérobactine-Fe³⁺ mais avec une

affinité plus faible. [226] Quant à DHB et DHBS, ces cathécolates peuvent aussi former des complexes avec Fe^{3+} , et sont récupérés par les récepteurs Fiu, Cir, Iha et FepA. [227, 228] Ces sous-produits de la biosynthèse de l'entérobactine semblent dans certains cas contribuer à la virulence. [228, 229] Nous présentons les structures des sidérophores produits par les souches virulentes d'*E. coli* dans la figure 7.

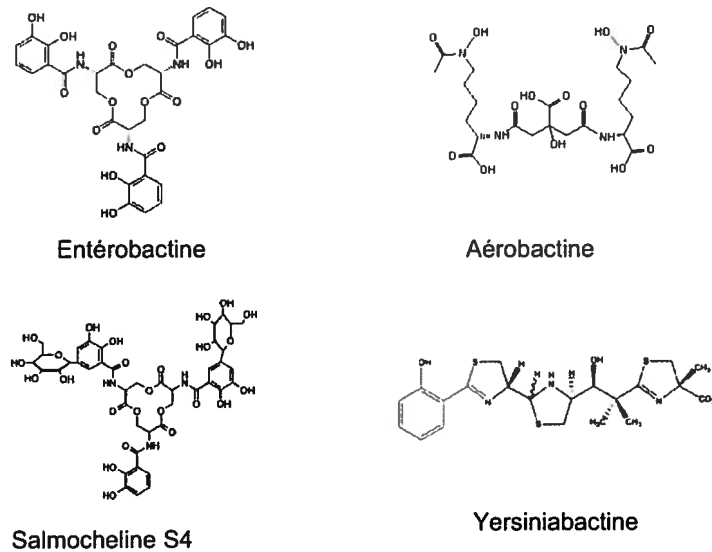


Fig.7 : Structure des sidérophores produits par certaines souches virulentes d'*E. coli*. Entérobactine et salmochéline appartiennent au groupe des sidérophores cathécolates. Il existe plusieurs salmochelines qui dérivent toutes de la glycosylation de l'entérobactine ou de ses dérivés. Aérobactine est un hydroxamate. Yersiniabactine est un sidérophore de structure mixte (aussi appelée phénolique).

IV I FeoABC :

Le plus connu des transporteurs des ions ferreux chez *E. coli* est FeoABC, le produit d'un opéron de trois gènes *feoA*, *feoB* et *feoC* présents chez toutes les souches d'*E. coli*. Malgré son nom, le transporteur FeoABC n'appartient pas à la famille des transporteurs ABC et le mécanisme de son transport n'est pas dépendant de l'ATP. Les rôles exacts de FeoA dont la taille est de 75 acides aminés et de FeoC dont la taille est de 78 acides aminés ne sont pas élucidés. FeoB est une protéine de 773 acides aminés et est considéré comme étant un transporteur permettant à Fe^{2+} de traverser la membrane cytoplasmique. [230] FeoB présente un groupement « protéine-G » intramolécule dans sa partie N-

terminale, c'est donc un homologue aux protéines G liant le GTP des cellules eucaryotes. Quatre des cinq domaines conservés des protéines G (G1-G4), ont été identifiés dans la structure moléculaire de FeoB, ce qui l'identifie en tant que GTP-ase potentielle. En fait, FeoB a démontré une activité de GTP-ase qui semble indispensable au transport de Fe^{2+} . Le transport de fer par FeoB, à la différence de celui des sidérophores, apparaît comme étant TonB indépendant. Le mécanisme exact de transport de Fe^{2+} par FeoB n'est pas déterminé, une des hypothèses avancées est que FeoB lie l'ion Fe^{2+} , en même temps que le GTP et que le transport implique des changements conformationnels, dont l'énergie est fournie par l'hydrolyse du GTP en GDP. FeoA et FeoC joueraient dans ce modèle le rôle de protéines régulatrices de l'entrée du fer dans le cytoplasme, bien que ces protéines ne soient pas aussi conservées que FeoB chez les différentes espèces bactériennes. [231]

Il est à noter que des protéines à forte similitude à FeoB sont très conservées chez les eubactéries, mais aussi chez les archéobactéries et les eucaryotes. Il est possible que FeoB soit une forme archaïque de transporteur de fer, couplé à une protéine-G apparue quand l'oxygène atmosphérique était encore rare et fer ferreux abondant. [232] Mais certains homologues de Feo chez d'autres espèces bactériennes sont impliqués dans le transport de Mn^{2+} et non pas de Fe^{2+} , d'où la suggestion de renommer ces homologues Meo. [64]

Quoi qu'il en soit, l'opéron *feo* est régulé par le régulateur du transport de fer Fur, mais aussi par le régulateur de l'anaérobiose FNR. [230] De plus, FeoB semble important lors de colonisation de sites anatomiques anaérobies, tels que l'intestin, car les mutants *feoB* d'*E. coli* K-12 sont affectés dans leur capacité de coloniser ce site. [233] Le Fe^{2+} est probablement présent dans l'intestin car le lumen intestinal est anaérobique et le fer provenant de la diète abondant. Enfin, le gène *feoB* de *Shigella* fait partie de ceux qui sont activés à l'intérieur de la cellule eucaryote de l'hôte. [54] Ces deux dernières caractéristiques en font un facteur de virulence potentiellement important dans les milieux dans lesquels Fe^{2+} serait disponible. FeoB est représenté dans la figure 8.

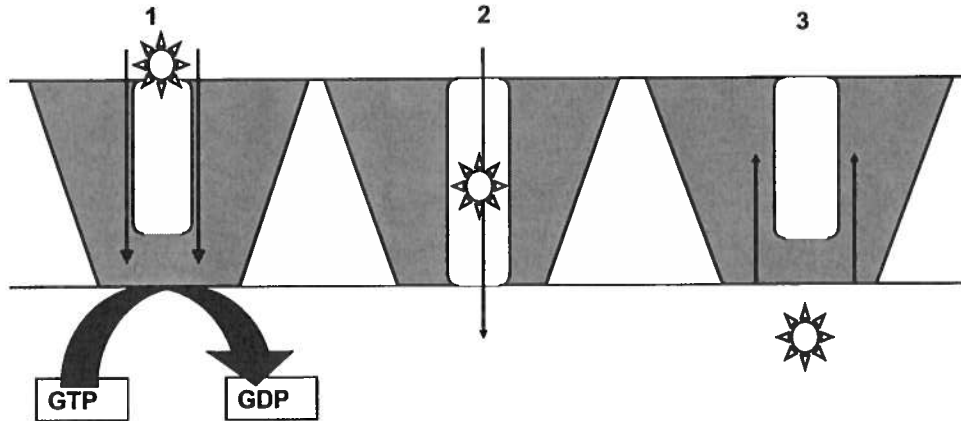


Fig.8 : Représentation schématique du fonctionnement de FeoB. (1) La fixation du soluté (le fer) provoque une lyse du GTP, ce qui fournit l'énergie pour les changements conformationnels permettant le transport du soluté. (2) Le soluté est transporté du périplasma au cytoplasme. (3) Retour du transporteur à la conformation initiale.

IV m SitABCD :

L'opéron *sitABCD* est absent du chromosome des souches d'*E. coli* K-12, mais est présent dans le génome de nombreuses souches ExPEC. [234] SitABCD appartient à une large famille de transporteurs : les perméases ABC (pour *ATP Binding Cassette*) dépendantes d'une protéine de liaison périplasmique PLBP (pour *Periplasmic Ligand Binding Protein*) spécialisées dans le transport des ions métalliques. Des analyses bioinformatiques de comparaison entre ce type de transporteurs provenant des différentes espèces bactériennes (amas C9 des transporteurs ABC), ont suggéré une capacité de transporter le manganèse et le zinc. [63] En fait, SitABCD appartient à la famille des transporteurs de fer ferreux et du manganèse. Les homologues les plus proches de SitABCD d'*E. coli* sont SitABCD de *Shigella sp.* et de *Salmonella enterica*. Le premier homologue de SitABCD décrit a été YfeABCD, un transporteur de fer et manganèse de *Yersinia pestis*. YfeABCD a été initialement considéré comme étant un transporteur de Fe^{2+} , par la suite il a été démontré que YfeABCD pouvait aussi transporter le Mn^{2+} . [59]

De façon similaire, lors de la découverte de SitABCD de *S. enterica*, celui-ci a été décrit comme un transporteur de fer chélaté. [235] Par la suite, il a été démontré que chez *Salmonella*, SitABCD est

avant tout un transporteur alcalin de Mn^{2+} , bien qu'il ait aussi une certaine affinité pour Fe^{2+} , Cd^{2+} et Zn^{2+} . [236] Une étude indépendante a confirmé que chez *Salmonella enterica* SitABCD et MntH sont responsables ensemble de la majeure partie du transport de Mn^{2+} , alors que SitABCD et FeoABC sont importants pour l'influx de Fe^{2+} . De plus, cette étude a lié SitABCD à la résistance aux effets toxiques de H_2O_2 . [56] Chez *Shigella*, SitABCD a été décrit en tant que transporteur de fer induit lors de l'entrée dans le milieu intracellulaire. [54] Nous avons caractérisé les affinités envers le manganèse et le fer de SitABCD de la souche APEC $\chi 7122$ et démontré sa capacité à accumuler le fer ferreux (affinité apparente pour Fe^{2+} env. $0,8 \mu M$, pour Fe^{3+} env. $3 \mu M$) et le manganèse et de restaurer la croissance d'une souche déficiente en transport du fer dans un milieu appauvri en ions métalliques. [77]

Nous avons aussi démontré que SitABCD est plus important que FeoABC ou MntH pour la virulence de la souche APEC $\chi 7122$ et que cette importance était probablement due à la capacité de SitABCD de transporter le manganèse, ce qui contribue à la résistance au stress oxydatif, alors que son rôle dans le transport du fer *in vivo* ne semblait pas crucial pour la virulence. [234] Le mécanisme de transport de SitABCD est le même que celui des autres transporteurs ABC, ce mécanisme est représenté dans la figure 4.

IV n Autres transporteurs de fer :

Une partie non négligeable de fer disponible dans le milieu interne de l'hôte se présente sous la forme de l'hème. Certaines souches pathogènes d'*E. coli* possèdent le transporteur ChuA permettant l'utilisation de l'hème en tant que source de fer. [237] De plus, des souches pathogènes d'*E. coli* contiennent des protéases permettant de lier et de cliver l'hémoglobine. [238, 239]

Un nouveau transporteur de fer ferreux d'*E. coli* a été récemment décrit, il s'agit d'EfeU. [240] En fait, EfeUOB apparaît en tant que transporteur tripartite de fer ferreux présent dans certaines souches d'*E. coli*, mais absent des souches K-12 dans lesquelles une mutation prévient l'expression d'EfeU. Ce transporteur est probablement important pour l'acquisition du Fe^{2+} dans des conditions aérobies, mais de pH acide. Il est régulé conjointement par le répresseur transcriptionnel du transport de fer Fur et par le système à deux composantes CpxAR. [241]

IV o Entreposage du fer chez les bactéries :

Le fer intracellulaire est lié, soit dans les sites catalytiques des enzymes dont il est le cofacteur, soit dans les groupements hème, soit encore dans les protéines de stockage. *E. coli* possède deux de ces protéines : la ferritine (FTN) et la bactérioferritine (BFR). Ces protéines ont pour homologues les

ferritines eucaryotes et sont encodées par le gène *finA* et le gène *bfr* se trouvant à proximité du gène *yheA* (une ferroxidase associée à la bactérioferritine). [16]

Quant aux protéines elles-mêmes, ce sont des multimères de forme sphérique, formés de 24 sous unités qui peuvent contenir des milliers (2000-3000) d'ions ferriques dans leur cavité centrale. Bfr est associée à des groupements hème d'où son ancienne appellation de cytochrome b1. La ferroxidase YheAp associée aux bactérioferritines permet l'oxydation de Fe^{2+} , qui est la forme sous laquelle le fer entre dans la cellule, en Fe^{3+} qui sera mis en réserve à l'intérieur des ferritines. Il faut remarquer que l'affinité de BFR et FTN vis à vis des ions ferriques est différente, ce qui indique des capacités de stockage différentes. En effet, BFR capte le fer plus avidement que FTN, ce qui permet d'avancer l'hypothèse selon laquelle FTN sert au stockage transitoire, alors que BFR servirait à un remisage à long terme du fer. Cette hypothèse semble soutenue par le fait que BFR est surtout synthétisée lors des périodes de croissance lente, dont la phase stationnaire, alors que la synthèse de FTN ne varie pas dans le temps. De plus la ferroxidase associée à FTN est plus active ce qui permet de lier le fer plus rapidement. Enfin FTN est plus instable *in vitro* et finit par être dégradée par les radicaux libres dont l'apparition semble être due à la présence des ions de fer ferreux qui servent de catalyseur à la réaction de Fenton. Quoi qu'il en soit, les mutants *finA* ont des défauts de croissance en milieu pauvre en fer et n'accumulent pas de fer pendant la phase de croissance exponentielle en milieu riche. [16, 242]

Une autre protéine capable de lier le fer est la protéine de détoxification du fer (Dps). Un multimère de 12 sous unités qui lie aussi le fer ferrique (env. 500 ions) provenant de l'oxydation du fer ferreux par le H_2O_2 , tout en se liant à l'ADN qu'elle protège ainsi du stress oxydatif. Cette protéine est surtout synthétisée en phase stationnaire grâce à l'intervention du facteur de transcription alternatif RpoS. [16]

En terminant, il nous faut noter que chez les bactéries, l'étude de ségrégation et des flux du fer intracellulaire apparaît actuellement assez ardue et les connaissances actuelles sur l'état du fer à l'intérieur de la cellule bactérienne sont fragmentaires.

IV p L'homéostasie bactérienne du fer:

L'élément le plus important du contrôle du métabolisme du fer chez *E. coli* est la protéine Fur (pour *ferric uptake repressor*), qui contrôle environ 90 gènes différents en adaptant leur expression à la disponibilité du fer. [243] Mais la régulation du métabolisme du fer dépasse l'action de ce régulateur global et implique aussi les régulateurs de la réponse au stress oxydatif OxyR et SoxRS, ainsi que l'ARN régulateur RyhB. [16, 27, 89]

Dans la majorité des cas Fur agit en tant que répresseur dépendant de son corépresseur Fe^{2+} . Fur est un homodimère formé de deux sous unités identiques de 17 kDa. Chaque unité lie un ion Fe^{2+} , ce qui permet la liaison du régulateur à l'ADN en augmentant son affinité d'un facteur 10^3 . En outre, chaque sous unité contient un ion Zn^{2+} structural unique, nécessaire à la dimérisation de Fur, mais insuffisant pour la liaison de Fur à l'ADN. [162]

Fur se lie à une séquence d'ADN spécifique (*Fur-box* ou *iron-box*) qui se trouve généralement en position -10 / -35 du promoteur. La séquence consensus du *Fur-box* est *GATAATGAT*(^A/_T)*ATCATTATC*, bien que cette séquence consensus ne se retrouve nulle part dans son intégralité au sein du génome d'*E. coli*. En effet une homologie de 11 bases sur 19 suffit à la liaison de Fur. [16] En fait, d'autres études plus récentes semblent démontrer que Fur se lie à un motif conservé *NAT*(^A/_T)*AT NAT* (^A/_T)*AT N AT*(^A/_T)*ATN* qui peut donc prendre des formes diversifiées. Par ailleurs, il semblerait que plus d'un dimère Fur peut se fixer sur un *Fur-box* si le motif hexanucléotide consensus est répété. Dans ce cas, la liaison d'un premier dimère entraînerait l'association en cascade d'autres dimères, l'amas total des régulateurs débordant ainsi de leur site de liaison spécifique. Il est à noter que les dimères Fur se fixent dans ce cas sur les deux brins de l'ADN, en entourant celui-ci d'une « gaine ». Enfin, il existe des cas exceptionnels dans lesquelles Fur exerce un control positif sur l'expression des gènes régulés, dans ce cas où Fur n'agit plus en tant que répresseur, aucune séquence consensus de liaison ne fut trouvée dans le promoteur des gènes concernés. [16]

La quantité totale des protéines Fur dans une cellule d'*E. coli* est très élevée, de 5000 en phase exponentielle de croissance et atteignant 10000 protéines par cellule en phase stationnaire. Une des explications possibles de cette abondance des protéines Fur, serait que celles-ci serviraient de « tampon », absorbant les variations de la quantité de fer intracellulaire en liant les ions Fe^{2+} qui sont la forme physiologiquement active de fer. En effet, l'affinité de Fur pour Fe^{2+} est $\approx 10 \mu M$, ce qui correspond à la concentration moyenne intracellulaire de Fe^{2+} . [16]

L'expression du gène *fur* est sous le contrôle positif des régulateurs de la réponse au stress oxydatif : SoxR/SoxS (superoxyde) et OxyR (peroxyde). Le gène *fur* fait partie d'un opéron avec le gène *fldA* encodant une flavodoxine qui serait responsable de la réduction de Fe^{3+} en Fe^{2+} fournissant ainsi les cofacteurs au régulateur Fur. Le site de liaison de SoxR est dans le promoteur commun de l'opéron, alors que le site de liaison de OxyR est en amont du gène *fur* et donc particulier de ce dernier. Il est donc clair que Fur est l'élément central du réseau de régulation liant le fer au stress oxydatif. Enfin, *fur* subit un autocontrôle négatif par l'intermédiaire d'un *Fur-box* partiellement conservé dans la région intergénique *fldA-fur*. [16, 89]

Le rôle de Fur débordé le cadre du contrôle de l'homéostasie du fer, car outre les gènes directement impliqués dans l'acquisition et la gestion du fer cellulaire (35 au total), d'autres gènes, parmi les 90 régulés par Fur, remplissent des rôles diversifiés. Ainsi, des gènes impliqués dans le métabolisme cellulaire, la respiration, la défense contre le stress oxydatif, la chimotaxie et la synthèse des flagelles et adhésines contiennent aussi des Fur-box dans leurs promoteurs. Les mutants *fur* d'*E. coli*, sont incapables de croître sur des sources de carbone non fermentables, ce qui implique un défaut de la respiration cellulaire et sont plus susceptibles au stress oxydatif ainsi qu'à la toxicité induite par le fer. [243] Nous avons présenté un schéma du fonctionnement du régulateur Fur dans la figure 9.

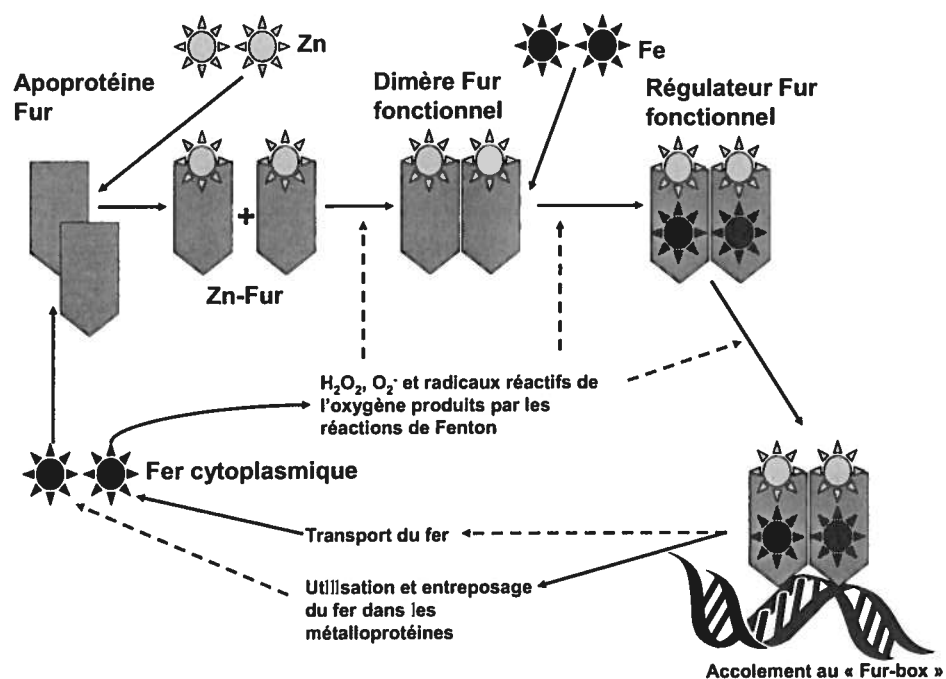


Fig.9 : Fonctionnement du régulateur Fur. Fur contrôle le transport et l'utilisation du fer. Le fonctionnement de Fur est affecté par le stress oxydatif.

Alors que Fur est surtout impliqué dans la gestion de l'homéostasie du fer dans les conditions où ce métal était en excès, un ARN non codant a été identifié en tant que facteur supplémentaire impliqué dans l'homéostasie du fer quand ce métal est présent en faible quantité. [27] Cet ARN régulateur nommé RyhB, est impliqué dans la modulation de la distribution du fer cellulaire en conditions de pénurie de fer. RyhB facilite la dégradation des ARNm des métalloprotéines fer-dépendantes facultatives, ce qui a pour conséquence de réorienter le fer cellulaire vers les usages obligatoires. [244] RyhB a aussi été impliqué dans la modulation de l'expression de fonctions

cellulaires qui ne sont pas directement liées au métabolisme cellulaire du fer. Ainsi chez *Shigella dysenteriae*, RyhB a été impliqué dans la régulation de l'expression de certains facteurs de virulence. [245] Chez la même espèce bactérienne, RyhB a aussi conjointement avec Fur été impliqué dans la gestion de la résistance à l'acidité. [246] Enfin, une étude récente semble indiquer que les expressions de Fur et de RyhB sont reliées par un contrôle négatif mutuel. [247] Le réseau transcriptionnel qui implique Fur, l'ARN régulateur RyhB, ainsi que deux régulateurs transcriptionnels SoxS et OxyR impliqués dans la réponse cellulaire au stress oxydatif, est représenté dans la figure 10.

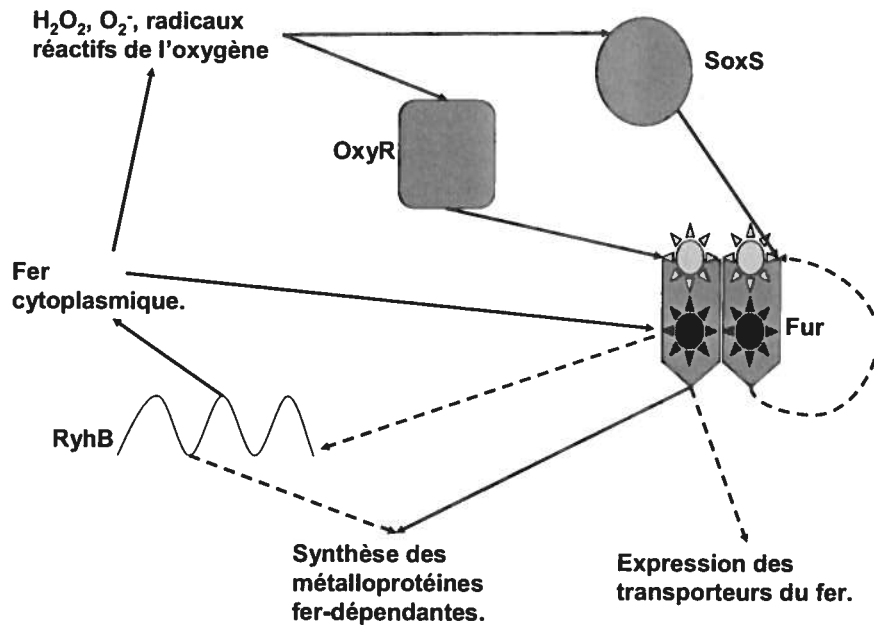


Fig.10 : Représentation du réseau transcriptionnel de Fur. Les flèches pointillées représentent la répression, alors que les flèches continues représentent l'induction. Fur inhibe la transcription de *ryhB*. L'ARN régulateur RyhB agit de façon post-transcriptionnelle en s'associant aux ARNm des gènes impliqués dans le métabolisme du fer. [27] Les régulateurs transcriptionnels OxyR et SoxS quant à eux agissent sur *fur*, dont ils induisent l'expression lors de l'augmentation du stress oxydatif.

IV q Le fer et la résistance au stress oxydatif:

Le fer contribue à la génération des radicaux réactifs dérivés de l'oxygène. Cette génération des sous-produits réactifs de l'oxygène, qui endommagent divers constituants de la cellule bactérienne, est la raison principale de la toxicité du fer. Face à un surplus de fer et à l'apparition d'un stress oxydatif, les cellules utilisent trois stratégies de défense : limitation de l'entrée de fer dans la cellule, diminution

de la disponibilité du fer intracellulaire et utilisation des enzymes de détoxification des radicaux réactifs d'oxygène. [89]

La diminution de l'entrée du fer dans la cellule se fait par la suppression de la transcription des gènes du transport de fer qui sont sous le contrôle de Fur. [243] Fur lui-même est sous le contrôle des deux principaux senseurs cellulaires du stress oxydatif : SoxRS et OxyR. [89] L'expression de Fur et le contrôle transcriptionnel qu'il exerce sont donc liés au stress oxydatif subi par la cellule. [248] De plus, Fur est lui-même endommagé par le stress oxydatif qui résulte en une oxydation des cystéines contenues dans cette métalloprotéine, aboutissant à la perte de la dimérisation nécessaire à la régulation transcriptionnelle. [162, 249]

La diminution de la disponibilité du fer cellulaire se fait par l'utilisation des protéines d'entreposage du fer : ferritine, bactérioferritine et Dps. [23, 250] La diminution de la disponibilité du fer cellulaire pourrait aussi se faire par l'efflux du fer excédentaire grâce au transporteur FieF. [251] Il est à noter que ce transporteur n'a pas encore été expérimentalement impliqué dans la résistance au stress oxydatif.

Les souches d'*E. coli* possèdent plusieurs enzymes de détoxification des radicaux réactifs d'oxygène. [89] La majorité des enzymes de détoxification des radicaux réactifs de l'oxygène sont des métalloprotéines. Parmi celles-ci les catalases KatG, KatE et la superoxyde-dismutase SodB ont pour cofacteur enzymatique le fer, alors que la superoxyde-dismutase SodA a pour cofacteur enzymatique le manganèse et la superoxyde-dismutase périplasmique SodC a pour élément structurel le zinc et pour cofacteur enzymatique le cuivre. [89, 92] Nous avons représenté les métallo-enzymes antioxydantes et leurs régulateurs transcriptionnels dans la figure 11.

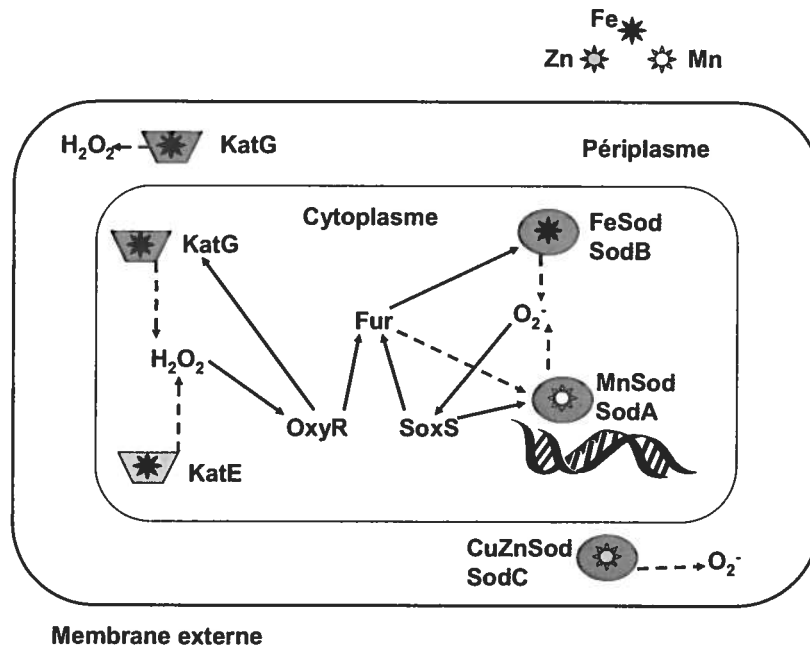


Fig.11 : Métales-enzymes antioxydantes, fonction et régulation transcriptionnelle. Flèches continues induction, flèches pointillées répression. Kat : catalases, Sot : superoxyde dismutases. Les régulateurs de la réponse au stress oxydatif OxyR et SoxS, ainsi que le régulateur de l'homéostasie du fer Fur sont au centre de la régulation de la réponse au stress oxydatif.

Étant donné que le stress oxydatif est impliqué dans l'action bactéricide des cellules immunitaires, la relation entre le stress oxydatif et le fer peut être d'une importance majeure lors du processus infectieux. [51] Par ailleurs, le fer n'est pas le seul métal interagissant avec le stress oxydatif cellulaire. Nous avons déjà décrit les propriétés antioxydantes du zinc dans la partie de la revue de la littérature concernant ce métal. Nous décrivons aussi l'action antioxydante du manganèse dans la partie de la revue de la littérature qui le concerne. Nous avons représenté l'interaction globale de ces trois métaux avec le stress oxydatif dans la figure 12.

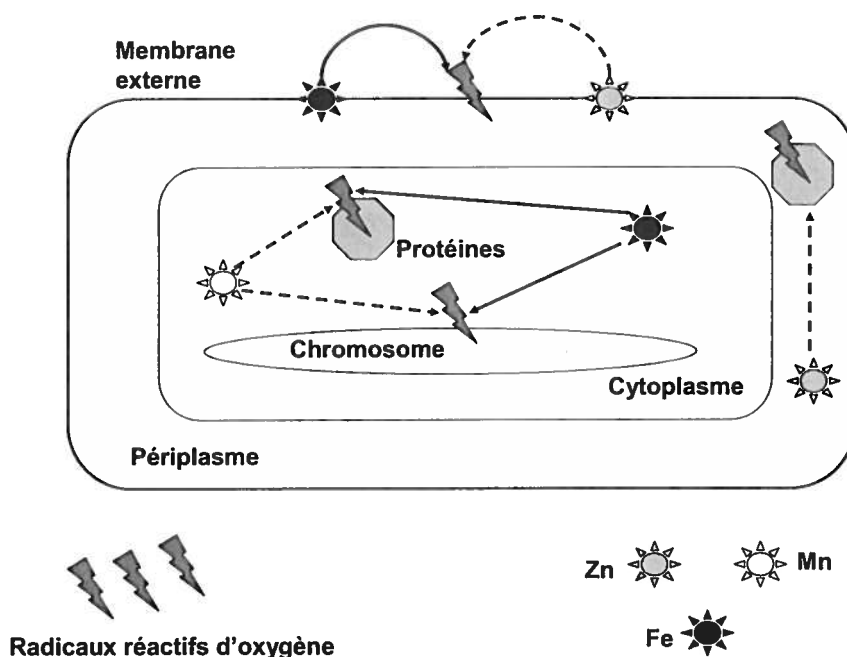


Fig.12 : Interactions entre les ions du fer, zinc, manganèse et le stress oxydatif. Flèches continues : induction, flèches pointillées répression. Alors que le manganèse et le zinc sont globalement des antioxydants, le fer est une source majeure du stress oxydatif ressenti par la cellule bactérienne. Le zinc protège surtout la membrane et le périplasme, alors que le manganèse protège surtout le cytoplasme. Le fer accroît le stress oxydatif à tous les niveaux.

Il est donc clair que des ions métalliques, autres que le Fe^{2+} / Fe^{3+} , peuvent aussi avoir un impact significatif sur la résistance au stress oxydatif. Par contre, il semblerait que le régulateur du transport de fer, Fur soit le seul régulateur du transport des ions métalliques divalents impliqué dans la régulation des superoxyde-dismutases SodA et SodB. La relation entre le fer et le stress oxydatif implique la régulation par Fur, la relation entre la régulation par Fur et le stress oxydatif est représentée dans les figures 5, 9, 10 et 11

Enfin, un autre type de stratégie, moins lié au fer, est celui impliquant la protection et la réparation des constituants cellulaires susceptibles d'être endommagés par le stress oxydatif. Ainsi des polyamines telles que la spermidine et la putrécine semblent être impliquées dans la résistance à l'action de l' H_2O_2 . [252] Des enzymes de faible poids moléculaire telles que la thioredoxine et la glutaredoxine, sont impliquées dans la réparation des groupements sulfhydryle abîmés par l'oxydation. [253] La thioredoxine et la glutaredoxine sont assistées par des chaperonnes protéiques telles que Hsp 33 qui permettent de replier correctement les protéines dénaturées par le stress oxydatif. [254]

Hsp33 contient un site de liaison de zinc sensible à l'oxydation, ce qui lui permet d'agir en tant que senseur du stress oxydatif. [255]

IV r Importance du fer lors de l'infection bactérienne :

Comme nous l'avons indiqué précédemment, le fer est limité par l'organisme hôte de façon à restreindre l'accès à ce métal qui est indispensable à la majorité des bactéries pathogènes. De plus, le fer peut être néfaste, autant pour les cellules de l'hôte que pour les bactéries pathogènes, à cause du stress oxydatif qui accompagne obligatoirement l'inflammation. Il en résulte que d'une part, certains pathogènes ont accumulé des systèmes de transport redondants pour obtenir le fer malgré les limitations imposées par l'organisme hôte et que d'autre part, certaines (rares) bactéries pathogènes, ou membres de la flore normale bactérienne, ont évolué de façon à se dispenser de l'utilisation du fer en le remplaçant par d'autres ions métalliques. [256, 257]

Les systèmes de transport de fer dépendants des sidérophores aérobactine, yersiniabactine et salmochéline ont été impliqués dans la virulence. [258-260] Ainsi, chez *E. coli* l'aérobactine est importante pour la virulence des souches ExPEC et elle est aussi importante pour la virulence de *Shigella sp.* [258, 261] La yersiniabactine est importante pour la virulence d'*Yersinia pestis*, de *Klebsiella pneumoniae* et aussi pour la formation des biofilms de la souche UPEC VR50. [262] Les salmochelines ont été impliquées dans la virulence de *Salmonella enteridis* et des ExPEC. [79, 260] De plus, FeoABC de certaines bactéries pathogènes a été impliqué dans la survie intracellulaire et la capacité de coloniser certaines niches anatomiques. [54, 263] Enfin, d'autres transporteurs tels que ChuA (hème) et Iha (sous produits de la synthèse de l'entérobactine) sont induits *in vivo* et peuvent dans certains cas contribuer à la virulence. [228, 264]

D'autre part, le système immunitaire intervient directement dans l'homéostasie du fer, puisque les cytokines sécrétées lors de l'inflammation affectent l'expression des systèmes de transport de fer de l'hôte. [43] L'hormone hepcidin qui est l'élément central de l'homéostasie du fer chez les mammifères a un potentiel bactériostatique et ressemble par certaines caractéristiques de sa structure à des peptides cationiques impliqués dans l'immunité innée. [212] De plus, les neutrophiles sécrètent la lipocaline NGAL (sidérocaldine) qui est capable de chélater l'entérobactine. [203] Enfin, le stress oxydatif généré par les cellules immunitaires affecte le métabolisme bactérien du fer en obligeant les bactéries à en diminuer l'utilisation et à dépenser de l'énergie pour combattre les effets du stress oxydatif auquel la présence du fer contribue. [51, 265, 266] Nous pouvons en conclure que la compétition pour le fer, ainsi que la régulation de son homéostasie se retrouvent à l'avant plan des interactions hôte pathogène

V Le manganèse

V a Caractéristiques physico-chimiques du manganèse :

Selon son abondance le manganèse est le cinquième métal et le douzième élément dans la croûte terrestre. Le manganèse (Mn), dont le numéro atomique est 25 et la masse atomique de 54,938 Da est un élément du groupe 8, de la période 4 et du bloc d du tableau périodique des éléments. Le rayon atomique du manganèse est de 140 pm. Sa structure électronique contient une couche électronique *d* contenant 5 électrons et une couche *s* contenant 2 électrons. Le manganèse peut adopter plusieurs états d'oxydation en perdant de 1 à 7 ou en gagnant jusqu'à trois électrons. Le manganèse est donc le métal pouvant adopter le plus grand nombre d'états d'oxydation différents, l'état d'oxydation le plus stable étant Mn^{2+} , un autre état minoritaire rencontré dans les conditions physiologiques est le Mn^{3+} . Toutes ces caractéristiques font du manganèse un métal de transition typique. Grâce à sa capacité de changer d'état d'oxydation, le manganèse agit en tant que cofacteur enzymatique dans un certain nombre d'enzymes. [20]

Le manganèse sous sa forme Mn^{2+} est moins toxique que certains autres ions divalents des métaux de transition (par exemple Fe^{2+} et Zn^{2+}). Sous sa forme divalente le manganèse est même bénéfique en tant que protection contre le stress oxydatif. Mais sous sa forme minoritaire Mn^{3+} qui apparaît de façon spontanée parmi les ions divalents, le manganèse peut causer l'apparition des radicaux réactifs d'oxygène (ROS pour *reactive oxygen species*). Dans ce cas, il peut y avoir des effets délétères sur le système nerveux central des eucaryotes supérieurs. C'est d'ailleurs la préoccupation majeure des chercheurs étudiant l'homéostasie du manganèse chez les eucaryotes. [267, 268]

V b Le manganèse dans la biologie:

Le manganèse est le cofacteur de plusieurs enzymes intervenant dans le métabolisme des sucres, lipides et protéines. Le manganèse est aussi impliqué dans la photosynthèse. Mais le rôle le plus important des enzymes dépendantes du manganèse (Mn^{2+}) est probablement la détoxification des ROS. En fait, plusieurs données indiquent que le manganèse est probablement capable de détoxifier ces radicaux de façon indépendante des enzymes et donc de contribuer par sa seule présence à la protection des cellules contre le stress oxydatif. Il est d'ailleurs à noter que certains microorganismes pathogènes ou de flore intestinale, soumis à des niveaux parfois élevés de ROS, ont tendance à modifier leur métallome de façon à minimiser l'utilisation du fer en le remplaçant (au moins partiellement) par le manganèse. [20, 257]

V c Le manganèse chez l'hôte:

Chez les eucaryotes supérieurs, le manganèse est un élément trace essentiel. En effet, le manganèse se retrouve dans les métallo-enzymes faisant partie des familles suivantes : oxydoréductases, transférases, hydrolases, lyases, isomérases et ligases. En tant que cofacteur enzymatique de ces enzymes, le manganèse est important pour le métabolisme énergétique (métabolisme des sucres et lipides) et le métabolisme des constituants cellulaires de base (protéines et lipides). De plus, le manganèse est le cofacteur de la superoxyde-dismutase (MnSOD ou SodA) qui protège les cellules contre les dommages provoqués par les ROS. La majeure partie du manganèse utilisé par notre organisme provient de l'alimentation, par absorption à travers les entérocytes en suivant la même route de transport que celle empruntée par le fer. Le taux tissulaire du manganèse est stable, environ 40% du manganèse corporel est entreposé dans les os. L'excès de manganèse est détoxiqué par le foie et mène à l'excrétion dans la bile. [268]

V d Transporteurs eucaryotes du manganèse:

Le transport du manganèse chez les eucaryotes est beaucoup moins détaillé dans la littérature que celui du zinc ou du fer. Ainsi, peu est connu sur l'entreposage du manganèse dans les cellules, son efflux si celui-ci existe, le contrôle hormonal du manganèse plasmatique et transcriptionnel du manganèse cellulaire. Comme nous l'avons précédemment indiqué l'entrée du manganèse se fait du lumen intestinal par la même route que l'entrée du fer : grâce au transporteur de fer DMT-1 (Nramp-2), son excrétion vers la circulation sanguine suit probablement aussi la voie empruntée par le fer à travers le ferroportin avec oxydation du Mn^{2+} en Mn^{3+} qui sera lié par la transferrine (Tf). Le complexe trivalent Tf-Mn sera lié par le transporteur de la transferrine TfR de la même façon que Tf-Fe et entrera la cellule par endocytose. D'autre part, le Mn^{2+} , étant la forme la plus stable dans les conditions biologiques, se retrouve aussi dans la circulation sanguine, ou de même que le zinc, il sera lié par l' α_2 -macroglobuline et l'albumine. Le manganèse divalent sera transporté à l'intérieur des cellules par DMT-1, puisque sa liaison avec l' α_2 -macroglobuline ou l'albumine est de faible affinité. [267, 268]

En ce qui concerne le contrôle hormonal systémique du manganèse, son existence est suggérée par le taux relativement constant du manganèse plasmatique. De plus, la distribution tissulaire du manganèse semble impliquer des mécanismes qui permettent de diriger les flux de ce métal vers les organes cibles. Mais encore là, les informations présentes dans la littérature à ce sujet sont peu détaillées. Quoiqu'il en soit, le schéma de distribution du manganèse est complété par sa détoxification dans le foie et son excrétion dans la bile sous forme d'un conjugué de la bilirubine. [267]

Les transporteurs Nramp sont sans doute les plus importants en ce qui concerne le transport eucaryote du manganèse. [204] Ainsi Nramp-2 (DMT-1) importe le manganèse divalent de l'intestin et permet aussi son transport du sang vers les cellules et des phagosomes, dans lesquels il s'est retrouvé après la dissociation de Tf-Mn et sa réduction, vers le cytoplasme cellulaire. [267] Nramp-1 intervient quant à lui dans le transport des ions métalliques (Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+}) des phagosomes des cellules phagocytaires. [205]

Les transporteurs de la famille Zip transportent Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} . Bien que le transport de manganèse ait pu être démontré expérimentalement pour certains représentants mammifères de cette famille, leur rôle dans l'homéostasie globale du manganèse reste imparfaitement décrit. [128, 269, 270]

Les transporteurs de la famille CDF pourraient aussi être impliqués dans l'efflux du manganèse chez les plantes et les champignons. Bien qu'on retrouve des transporteurs CDF chez les animaux supérieurs et qu'ils sont parfois classés comme des transporteurs potentiels de manganèse, leur implication dans l'homéostasie du manganèse chez les mammifères n'a pas été vérifiée. [124, 125] Il est à noter que des représentants de ces trois familles de transporteurs existent aussi chez les bactéries. Les transporteurs de ces trois familles sont énergisés par le gradient chimiosmotique (voir Fig. 6).

V e Homéostasie eucaryote du manganèse:

Étant donné que le manganèse partage jusqu'à un certain point les mécanismes de transport du fer, il est possible que certains mécanismes de la régulation du transport du fer s'appliquent aussi à celui du manganèse. Ce sujet est un des nombreux sujets concernant le manganèse qui sont peu décrits dans la littérature scientifique. Ce qui est connu suggère que la métallothionéine est impliquée dans l'entreposage du manganèse cellulaire, de même qu'elle l'est dans celui du zinc.

V f Manganèse et l'immunité :

Il semblerait que l'induction par le manganèse de l'expression de la métallothionéine dans le foie soit dépendante d'IL-6. [271] Il est intéressant de remarquer que l'action d'IL-6 se fait aussi sentir au niveau de l'expression du transporteur Zip14, induit dans le foie par l'action de cette interleukine et responsable du transport du Zn^{2+} . Ce transporteur contribue à l'hypo-zincémie apparaissant en phase aiguë de l'inflammation. Zip14 semble aussi capable de transporter le Fe^{2+} . [44, 208] Ce transporteur est aussi capable de transporter le Mn^{2+} *in vitro*, ce qui suggère que son expression accrue, couplée à celle de la métallothionéine, peut probablement mener en phase aiguë de l'inflammation à un stockage du manganèse autant que celui du zinc dans le foie.

Un des rôles les plus importants joués par le manganèse cellulaire est celui du cofacteur enzymatique de la MnSOD qui permet de détoxifier le superoxyde. Étant donné que l'inflammation s'accompagne d'un fort stress oxydatif, il est probable que l'expression de cette enzyme ait un effet positif sur la survie des cellules de l'hôte, dont les cellules phagocytaires, durant l'inflammation. [272] Il est aussi probable que cette enzyme soit impliquée dans la régénération des tissus. [273] Ainsi, le manganèse pourrait être bénéfique lors de l'action du système immunitaire, puisqu'il contribue à la protection des cellules contre le stress oxydatif généré par les cellules immunitaires et à la régénération des tissus lésés.

Enfin, une étude récente a démontré l'implication de la protéine calprotectine, sécrétée par les neutrophiles présents dans un foyer inflammatoire, dans le contrôle de la prolifération de certaines bactéries infectieuses. Cette protéine bactériostatique est un chélateur du zinc et du manganèse, mais elle semble surtout agir sur le manganèse dans les *loci* infectés. [45] Il est donc possible qu'en plus des mécanismes systémiques de régulation du taux de manganèse, des mécanismes locaux, dépendants de l'intervention du système immunitaire, soient employés afin de priver les bactéries pathogènes de ce métal essentiel.

V g Le manganèse chez les bactéries :

L'homéostasie du manganèse est mieux comprise chez les bactéries que chez les eucaryotes. Ce métal de transition est un élément essentiel du métallome bactérien et ses transporteurs, ainsi que leur régulation transcriptionnelle, sont bien documentés. Ce qui reste encore peu étudié c'est l'implication du manganèse dans le métabolisme bactérien, puisque seulement un nombre limité de métallo-enzymes dépendantes du manganèse ont été identifiées chez les bactéries. Nous allons citer certaines de ces enzymes pour souligner l'hétérogénéité des mécanismes catalysés en utilisant Mn^{2+} en tant que cofacteur enzymatique, ainsi que l'importance de leur impact sur la physiologie cellulaire bactérienne.

Parmi ces enzymes, certaines interviennent dans le métabolisme des constituants fondamentaux de la cellule : les protéine-phosphatases PrpA et PrpB (phosphorylation des protéines), les aminopeptidases-P PepP et PepQ (métabolisme des protéines), les lipide-phosphotransférases (phosphorylation des lipides), les ribonucléotide-réductases NrdAB et NrdEF (métabolisme des acides nucléiques), enfin les polysaccharide-synthétases (synthèse des polysaccharides dont certains sont extracellulaires et importants pour la formation des biofilms). [20]

D'autres enzymes interviennent dans le catabolisme des sucres et le métabolisme central des sources de carbone. Le Mn^{2+} est capable de s'associer à l'ATP en formant le MnATP. Certaines

enzymes utilisant de l'ATP sont soit fortement stimulées par de faibles concentrations de Mn^{2+} , soit manganèse-dépendantes. C'est le cas de l'énolase (encodée par le gène *eno*), de la pyruvate-kinase (*pyk*), de la PEP-carboxylase (*ppc*) et de la PEP-carboxykinase (*pck*). De plus, deux isoformes de la phosphoglycérmutase existent, dont GpmM est manganèse dépendante (encodée par le gène *yibO* chez *E. coli*) et il en va de même de la fructose 1,6-diphosphate phosphatase (l'isoforme Mn^{2+} -dépendante encodée chez *E. coli* par *glpX*). En fait, il semblerait que ces enzymes permettent une plus grande flexibilité dans le flux des métabolites du métabolisme central du carbone et les flux d'énergie liés à ce métabolisme. [20, 31]

Des enzymes manganèse-dépendantes interviennent dans la défense de la cellule bactérienne contre le stress oxydatif : la superoxyde-dismutase à manganèse MnSOD (SodA) et la catalase non-hème KatN. [20]

Enfin, des enzymes dépendantes du manganèse ou fortement stimulées par la présence de Mn^{2+} sont impliquées dans la gestion de deux messagers secondaires dérivés du guanylate : (p)ppGpp et c-di-GMP. En effet, l'alarmone de la réponse stringente (p)ppGpp est synthétisée par la (p)ppGpp-synthétase I RelA en réponse à l'apparition des ARNt non chargés, signalant une carence en acides aminés. Un effet direct de l'apparition du (p)ppGpp est une diminution de la production des ribosomes et donc un ralentissement de la synthèse protéique, suivi d'un ralentissement de la croissance. Le second effet est la stimulation de la synthèse des acides aminés manquants. Le troisième effet est la conséquence des deux premiers, c'est une croissance ralentie et un maintien de la viabilité cellulaire en phase stationnaire avec un métabolisme adapté aux nutriments disponibles. L'alarmone (p)ppGpp est dégradée par la (p)ppGpp-pyrophosphatase Mn^{2+} -dépendante SpoT, en absence de laquelle le taux élevé de (p)ppGpp dévient létal pour la cellule. De plus, SpoT est aussi capable de synthétiser le (p)ppGpp en réponse à une baisse de la quantité des sucres et des lipides cellulaires, c'est donc la (p)ppGpp-synthétase II, mais cette fonction est indépendante du Mn^{2+} . Les mutations *spoT* sont létales, sauf si elles sont faites dans des souches préalablement mutées *relA*, dans quel cas les mutants *relA/spoT* sont des auxotrophes obligatoires qui nécessitent l'ensemble des acides aminés pour une croissance ralentie. L'action de RelA/SpoT permet donc aux bactéries de s'adapter à une déplétion des nutriments et par conséquent de survivre à des fluctuations dans la disponibilité des acides aminés, sucres et lipides. [274]

Le second messenger c-di-GMP (un dimère cyclique du GMP) est produit par les protéines dotées des motifs peptidiques GGDEF, qui sont donc des diguanylate-cyclases et est dégradé en diguanilate linéaire pGpG par les phosphodiesterases dotées des motifs peptidiques EAL. [275] Le c-di-GMP est central pour la régulation d'un grand nombre de fonctions cellulaires et est particulièrement

important pour la motilité bactérienne et la formation des biofilms, ce qui peut avoir un impact sur la virulence bactérienne. [276] Les phosphodiesterases EAL qui dégradent le c-di-GMP ont besoin de Mn^{2+} pour leur activité enzymatique. La perte de fonction de la phosphodiesterase EAL CdgR de *S. enterica* Typhimurium (dont l'équivalent chez *E. coli* est encodé par le gène *ydiV*) a provoqué une augmentation du niveau c-di-GMP cellulaire d'un facteur de sept et s'est accompagnée d'une hypersensibilité au H_2O_2 . [31]

Il n'est donc pas étonnant que le manganèse soit indispensable pour la survie des bactéries pathogènes dans le milieu interne de l'hôte. Nous avons déjà mentionné que certaines bactéries pathogènes, ou de la flore normale, remplacent le fer par le manganèse et il en va de même pour les bactéries extremophiles qui sont soumises à des stressés physicochimiques importants. Il est à noter que les bactéries sont capables d'accumuler des concentrations cellulaires élevées de Mn^{2+} (de l'ordre du mM), et de varier rapidement ces concentrations (de trois ordres de magnitude en quelques minutes), même quand le milieu dans lequel elles évoluent est pauvre en manganèse. [20] Les transporteurs de manganèse sont donc fondamentalement importants pour la survie des bactéries dans les milieux changeants et / ou stressants, dont le milieu interne de l'organisme de l'hôte auquel sont confrontées les bactéries pathogènes. [31, 257, 277]

V h Transporteurs bactériens du manganèse :

Il existe chez *E. coli* trois types de transporteurs, pour lesquels le transport du manganèse a été expérimentalement démontré : il s'agit de MntH, SitABCD et ZupT. Ces trois transporteurs appartiennent à des familles différentes du point de vue de leur architecture moléculaire et des sources d'énergie utilisées. Les affinités relatives de transport ont été définies pour MntH et SitABCD, mais pas pour ZupT.

V i MntH :

En ce qui concerne MntH (encodé par le gène *yfeP* d'*E. coli*), il appartient à la famille des transporteurs Nramp (SLC11 *solute linked carrier* 11), si importants pour le transport du fer chez l'hôte et très présents autant chez les eucaryotes que les procaryotes. Le transport par Nramp est énergisé par le gradient des protons (voir Fig.6). Les transporteurs mammifères Nramp-1 (spécifique des phagocytes) et Nramp-2 (DMT-1 présent généralement dans les cellules) sont des transporteurs responsables du transport des cations divalents métalliques, dont Mn^{2+} et le Fe^{2+} . [204] Leur contrepartie bactérienne, MntH est aussi un transporteur de Mn^{2+} et de Fe^{2+} . Les transporteurs de cette famille ont tous la même structure protéique : ce sont des protéines de la membrane interne qui sont

repliés en huit segments transmembranaires (TMS *transmembrane segments*), dont les TMS-I et TMS-VI semblent être les plus importants pour le transport couplant l'import du métal à un transport des protons. [278]

L'affinité apparente de MntH envers les ions métalliques a été investiguée : l'affinité du transporteur pour le manganèse était de 0,1 μM chez *S. Typhimurium* et entre 0,5 à 1 μM chez *E. coli*. Le fer ferreux était transporté avec une affinité inférieure à celle du manganèse, sa constante d'affinité apparente était pH-dépendante et plus avantageuse en milieu acide (25 à 50 μM chez *S. Typhimurium*, 100 à 200 μM chez *E. coli*). La constante d'inhibition du transport du manganèse par le fer ferreux chez *S. Typhimurium*, était aussi pH-dépendante (7 à 100 μM). Quant au fer ferrique, chez *S. Typhimurium* il n'inhibait le transport de manganèse qu'avec une constante d'inhibition pH-indépendante et inférieure à celle de la constante d'affinité pour le manganèse (50 μM). [207] Ces données présentent donc MntH comme un transporteur hautement sélectif pour le manganèse. Le problème avec ces données, est que les expériences de transport ont été menées avec des souches d'*E. coli* et *S. Typhimurium* qui possédaient d'autres systèmes de transport de fer (sidérophores pour Fe^{3+} , FeoB pour Fe^{2+}), systèmes qui ont dû affecter le taux réel de fer disponible dans le milieu de transport et donc biaiser les constantes d'affinité et d'inhibition de transport pour ce métal. De plus, une étude indépendante a clairement démontré que l'induction de MntH permettait l'entrée de fer chez *E. coli*. [206] Étant donné que Nramp-2 (DMT-1), l'homologue eucaryote de MntH est le principal transporteur de fer ferreux chez les mammifères, nous pouvons conclure que la question du transport du fer par MntH n'a pas été totalement élucidée.

Étant donné la similarité de structure entre MntH et les transporteurs Nramp, une hypothèse de compétition directe pour le substrat transporté entre les transporteurs bactériens d'une part et eucaryotes d'autre part a été énoncée. Il est possible que cette compétition ait lieu au niveau des pathogènes intracellulaires phagocytés, tels que *Salmonella enterica*. Quoiqu'il en soit, la perte de la fonction encodée par le gène *mntH* ne suffisait pas à rendre les souches mutantes dérivées de *S. enterica* Typhimurium avirulentes. [20] Ce qui suggérait la présence d'un autre transporteur de manganèse. Ce transporteur a été identifié comme étant SitABCD.

V j SitABCD :

Chez *E. coli*, SitABCD est présent chez les souches ExPEC, mais absent des souches commensales et très rare chez les autres souches pathogènes. Ce transporteur appartient comme ZnuACB à la famille des transporteurs ABC énergisés par l'ATP (voir Fig.4). Nous avons déjà présenté SitABCD d'*E. coli* APEC χ 7122 dans la partie portant sur le transport du fer. Nous n'allons

donc présenter ici que les données pertinentes au transport du manganèse par SitABCD d'*E. coli* et *S. Typhimurium*.

SitABCD d'*E. coli*, exprimé à partir d'un plasmide de nombre moyen de copies, permettait une accumulation de manganèse dans une souche mutée ayant perdu la fonction *mntH*. Cette accumulation était moins efficace que celle effectuée par MntH exprimé dans la même souche à partir du même type de vecteur. En outre, cette accumulation était pH-dépendante, comme d'ailleurs celle de MntH et les deux transporteurs avaient des profils de transport complémentaires : alors que MntH transportait mieux à pH acide, SitABCD transportait mieux à pH alcalin. L'affinité apparente de SitABCD pour le manganèse était de 4 μM , la constante d'inhibition du transport du Mn^{2+} par Fe^{2+} était de 7 μM et par Fe^{3+} de 13 μM . Il est à noter que l'affinité de SitABCD pour le fer ou le manganèse dépendait de la souche utilisée : dans une souche mutante ayant perdu la capacité de transporter le fer, SitABCD avait une affinité plus élevée pour le fer, alors que dans une souche ayant perdu la capacité de transporter le manganèse, SitABCD avait plus d'affinité pour le manganèse. [77] En ce qui concerne les affinités de transport de SitABCD de *S. Typhimurium*, elles étaient de 0,1 μM pour le manganèse et de 5 à 20 μM pour le Fe^{2+} en variant en fonction du pH. Le Fe^{3+} était transporté avec une affinité très faible, démontrée par une capacité d'inhiber le transport de manganèse avec une constante d'inhibition d'environ 100 μM . SitABCD de *Salmonella* avait donc été catalogué en tant que transporteur de manganèse. [236] Mais la même réserve, que celle précédemment exprimée concernant les affinités déterminées pour MntH, s'applique aussi pour SitABCD de *S. Typhimurium* : les autres transporteurs de fer actifs dans cette souche ont dû biaiser les constantes obtenues pour Fe^{2+} et Fe^{3+} . Il est à noter que YfeABCD, l'homologue de SitABCD chez *Y. pestis* semble être surtout un transporteur de Fe^{2+} *in vivo*, bien qu'il soit aussi capable d'accumuler du Mn^{2+} *in vitro*. [279] Quoiqu'il en soit des affinités de transport apparentes *in vitro*, ou des fonctions de transport réelles *in vivo*, trois études ont impliqué SitABCD de *S. Typhimurium* et APEC χ 7122 dans la virulence. [56, 58, 234]

V k ZupT :

ZupT appartient à la famille des transporteurs Zip, nous avons déjà abordé les transporteurs de cette famille dans les parties de la revue de la littérature portant sur le zinc et le fer. De même que MntH, ZupT est dépendant d'un gradient chimiosmotique (voir Fig.6), mais dans ce cas le substrat cotransporté est inconnu (chez les transporteurs Zip eucaryotes il peut s'agir des carbonates). Une étude expérimentale a montré la capacité de ZupT d'*E. coli* de transporter le zinc, le fer et le manganèse. Les affinités de transport de ZupT ne sont pas connues, mais on considère ZupT avant tout comme un transporteur de zinc. [188]

Enfin, il faut noter que bien que FeoABC des entérobactéries est considéré comme étant uniquement un transporteur de fer ferreux, ses homologues dans d'autres espèces transportent du manganèse. Il faut souligner que la capacité de FeoB à transporter des métaux autres que le fer, n'a jamais été analysée. [64]

VI Homéostasie bactérienne du manganèse :

Il existe chez les entérobactéries un régulateur spécifique du transport du manganèse : MntR, Fur est aussi capable de réguler les transporteurs de manganèse et la régulation de transport de manganèse est aussi liée à celle du stress oxydatif, en particulier par OxyR. [20]

MntR appartient à la famille des régulateurs transcriptionnels DtxR, dont fait aussi partie le régulateur fer-dépendant de la toxine diphtérique. Des études réalisées chez *B. subtilis* montrent qu'en plus du manganèse, MntR est aussi capable de lier d'autres ions métalliques dont le cobalt et le cadmium, mais ne semble pas lier le fer. [280, 281] Après la liaison de deux ions Mn^{2+} , MntR subit des changements conformationnels, stabilisant la structure de la protéine et permettant la liaison à l'ADN. [280, 282, 283] La constante d'affinité de la forme apo-MntR pour l'ADN est de 8 μM , la liaison du Mn^{2+} à MntR renforce la liaison à l'ADN en diminuant la constante d'affinité à 16 nM et permettant la fixation de MntR à sa séquence de liaison. [31] Une étude menée chez *E. coli* a montré que MntR se lie à une séquence quasi palindromique située dans le promoteur de *mntH* (MntR-box : AAACATAGCCT TTGCTATGTTT), cette séquence est assez conservée dans les autres promoteurs des gènes régulés par MntR chez *E. coli* et les autres espèces bactériennes. [284] La séquence MntR-box est aussi retrouvée dans le promoteur de l'opéron *sitABCD* (AAACATAGTAG TTGCTATGTTT) dans lequel elle chevauche la séquence -10. [77]

Les transporteurs de manganèse MntH et SitABCD sont aussi contrôlés par Fur. Leurs promoteurs contiennent des séquences Fur-box (GCTAATGATAATTATTAC pour le promoteur de *sitABCD*). La régulation par Fur peut être Fe^{2+} ou Mn^{2+} -dépendante, puisque Fur est capable de lier le manganèse. [285] D'ailleurs chez certaines α -protéobactéries, l'homologue de Fur est en fait un régulateur du transport de manganèse (Mur). [286] Quoiqu'il en soit, Fur régule non seulement l'expression des deux transporteurs de manganèse des entérobactéries, mais aussi celle de la superoxyde-dismutase à manganèse MnSod (SodA). D'autres régulateurs dépendants du fer régulent aussi l'expression de cette enzyme. [287]

La relation entre le fer, le manganèse et le stress oxydatif est d'ailleurs soulignée par le fait que *mntH* est régulé par OxyR. Ce n'est apparemment pas le cas de *sitABCD*, bien que étant donné qu'OxyR régule *fur* et que Fur à son tour régule les opérons des deux transporteurs de manganèse on

peut considérer que OxyR régule l'ensemble du transport de manganèse. La relation entre OxyR et les transporteurs de manganèse n'est pas fortuite, en effet OxyR est impliqué dans la résistance au H₂O₂, alors que la perte de *sitABCD* et de *mntH* provoque une sensibilité accrue au stress oxydatif induit par le peroxyde. Cette perte de résistance est très certainement due à un transport de manganèse diminué. [62, 77, 234] Il est par contre difficile de juger si le manganèse joue dans ce cas un rôle de cofacteur enzymatique, ou s'il exerce son rôle d'antioxydant de façon indépendante des enzymes. [20] Nous avons présenté la régulation transcriptionnelle des transporteurs de manganèse (ainsi que du fer et du zinc) dans la figure 5 (Fig.5).

V m Le manganèse et la résistance au stress oxydatif :

Nous avons déjà décrit les mécanismes par lesquels les résidus réactifs de l'oxygène (ROS) provoquent la dégradation des composantes cellulaires. Nous avons aussi fait part de l'implication du fer dans les réactions de Fenton qui aggravent le stress oxydatif ressenti par les cellules. Nous allons maintenant nous pencher sur les mécanismes par lesquels le manganèse permet de résister au stress oxydatif. Le manganèse agit de deux façons : d'une part c'est le cofacteur enzymatique de la superoxyde-dismutase à manganèse (MnSOD ou SodA), d'autre part le manganèse est capable dans certaines conditions de détoxifier les résidus réactifs d'oxygène de façon non-enzymatique (sans être lié par une métalloprotéine). [20]

En tant que cofacteur enzymatique de SodA (MnSod), le manganèse joue un rôle dans la protection de l'ADN. En effet, cette enzyme semble surtout se localiser à proximité de l'ADN, alors que la FeSod (SodB) est distribuée dans le cytoplasme et serait donc plus importante pour la protection des protéines cytoplasmiques. Par conséquent, la MnSod pourrait contribuer à diminuer spécifiquement l'action mutagène des résidus réactifs de l'oxygène. [53, 91]

Il faut souligner que l'activité toxique du superoxyde est fortement liée à la présence du fer et du H₂O₂. Ces trois éléments interagissent selon la réaction de Fenton qui aboutit à la formation du radical hydroxyle. En fait, le stress oxydatif va endommager les noyaux fer-soufre, en relâchant le fer et favorisant les réactions de Fenton. [93, 288-290] De plus, le stress oxydatif endommage les cystéines qui interviennent dans la liaison d'un ion Fe²⁺ dans le site de nombreuses métalloprotéines. [291]

Il est à noter que l'une de ces métalloprotéines n'est nulle autre que Fur, le régulateur transcriptionnel de l'import du fer. Par conséquent, le stress oxydatif peut inactiver la régulation du transport de fer en augmentant l'import de ce métal qui va contribuer encore plus à augmenter le stress oxydatif. [249] Les mutants *fur* sont particulièrement affectés par le stress oxydatif. [248] Or nous

avons vu plus haut que Fur est capable de lier le manganèse et que cette liaison n'affecte probablement pas la régulation Fur-dépendante. [20] La liaison du Mn^{2+} par Fur (MnFur), en remplacement du Fe^{2+} (FeFur), pourrait être un mécanisme supplémentaire de protection contre le stress oxydatif. En effet, alors que FeFur contribuerait à propager le stress oxydatif par l'action du fer relâché, ce ne serait évidemment pas le cas de MnFur.

De plus, comme indiqué plus haut, Mn^{2+} a des propriétés antioxydantes non-enzymatiques. Des molécules organiques contenant du Mn^{2+} miment l'action de la MnSod et sont capables de détoxifier le superoxyde de façon non-enzymatique. [292] Il est donc possible que l'accumulation du Mn^{2+} en quantité suffisamment élevée (le Mn est accumulé à des concentrations allant jusqu'à l'ordre du mM) permet aux bactéries de résister au stress oxydatif sans que la MnSOD soit le principal outil de cette résistance. [20] Ce mécanisme a en particulier été évoqué pour les bactéries fer-indépendantes telles que les *Lactobacilli*. [257] Il semblerait que le même type de protection soit aussi important pour d'autres bactéries, dont certaines espèces pathogènes. [293]

V n Importance du manganèse lors de l'infection bactérienne :

L'importance du manganèse pour la virulence provient du fait que la quantité de cet ion métallique essentiel est réduite dans le milieu interne de l'organisme hôte. En effet, de même que d'autres métaux essentiels (par exemple fer et zinc), le manganèse sera monopolisé par les cellules de l'hôte en utilisant les mécanismes de transport que nous avons décrits précédemment. De plus lors de l'infection, des mécanismes immunitaires vont intervenir pour diminuer encore plus la disponibilité des ions métalliques. Les transporteurs permettant aux bactéries pathogènes d'obtenir les ions métalliques nécessaires, seront à ce moment-là de première importance. C'est d'autant plus vrai pour les transporteurs de manganèse, puisque ce métal contribue à la résistance au stress oxydatif généré par l'action des cellules immunitaires. [31, 277]

Les transporteurs de manganèse contribuent à la virulence des bactéries pathogènes aussi diverses que *Yersinia pestis* (transporteur impliqué YfeABCD), *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (transporteurs impliqués MntH et SitABCD), *E. coli* APEC χ 7122 (MntH et SitABCD), *Streptococcus pyogenes* (MtsABC), *Streptococcus pneumoniae* (PsaBCA) et *Bacillus anthracis* (MntABC). [56, 58, 59, 234, 294-297]

Lors d'une étude dans le modèle expérimental murin, la perte de fonction du système Yfe d'*Yersinia pestis* s'est soldée par une perte de virulence (diminution de la DL50 d'un facteur 10^6) lors de l'administration par voie intraveineuse et une atténuation significative (diminution de la DL50 d'un facteur 10^{2+}) par voie sous-cutanée. [59]

L'atténuation de la virulence des mutants *sit* et *sit / mntH* de *S. Typhimurium* a été démontrée dans le modèle de la fièvre typhoïde de la souris. Le rôle de SitABCD semblait être plus important que celui de MntH lors de ces infections expérimentales. Les souris mutantes NRAMP- (donc susceptibles à l'infection par *S. Typhimurium*) inoculées avec ces mutants avaient un temps médian de survie nettement supérieur à celui des souris inoculées avec la souche de type sauvage, mais étaient néanmoins tuées. Il est à noter que la souche mutante *tonB* qui a perdu la capacité d'importer les sidérophores était aussi virulente que la souche de type sauvage, alors que la souche mutante *feo* était atténuée et les souches mutantes *sit / feo*, *mntH / feo* et *sit / mntH / feo* étaient avirulentes. La perte du transporteur MntH seul ne semblait pas provoquer une atténuation de la virulence. Il apparaît donc que l'acquisition du Mn^{2+} et du Fe^{2+} sont plus importantes que celle du Fe^{3+} dans ce modèle et que SitABCD et FeoABC sont les transporteurs les plus importants pour l'acquisition de ces deux ions métalliques. [56]

D'autre part, chez la souche APEC χ 7122 les mutants *sit* et *sit / mntH* étaient atténués dans le modèle expérimental de la colibacillose aviaire. Il est à noter que dans ce modèle expérimental le rôle de SitABCD était prépondérant, MntH jouait un rôle secondaire, alors que la contribution de FeoABC à la virulence était loin d'être aussi importante que chez *S. Typhimurium*. [234]

Il est à noter que quand les phénotypes liés au stress oxydatif étaient vérifiés lors des études portant sur la virulence des mutants ayant perdu la capacité de transporter le manganèse, leur atténuation s'accompagnait d'une sensibilité accrue au stress oxydatif.

Il est aussi intéressant de noter que bien que les transporteurs de manganèse appartiennent à la famille Nramp chez l'hôte, la majorité des transporteurs du manganèse directement impliqués dans la virulence bactérienne appartiennent au groupe C9 des perméases ABC. [63, 204] De plus, chez *E. coli* SitABCD (perméase ABC du groupe C9) est présent uniquement chez les souches virulentes Gram positives, alors que MntH (transporteur homologue à Nramp) est présent chez toutes les souches. [234] Donc les perméases ABC apparaissent en tant que transporteurs du manganèse les plus liés à la virulence.

VI Les transporteurs ABC

VI a Perméases ABC :

Les perméases ABC (pour *ATP Binding Cassette*) sont une des familles protéiques les plus importantes du point de vue du nombre et de la distribution phylogénétique. Présents parmi les procaryotes et les eucaryotes ces transporteurs sont responsables de l'import (procaryotes seulement) et de l'efflux de différents solutés (procaryotes et eucaryotes). Ces perméases sont des systèmes composés de plusieurs domaines qui peuvent parfois être des protéines indépendantes ou parfois des protéines fusionnées (surtout chez les eucaryotes). [182]

Les perméases ABC responsables de l'import sont dépendantes des protéines de liaison au soluté, qui vont capter leur ligand à l'extérieur de la membrane interne, ces protéines PLBP (pour *Periplasmic Ligand Binding Proteins*) sont responsables de l'affinité très élevée des perméases ABC pour leur substrat. Les PLBP sont des protéines périplasmiques chez les bactéries Gram négatives et des lipoprotéines (dans ce cas on utilisera la désignation de récepteur) chez les bactéries Gram positives. Des perméases transmembranaires homo ou hétérodimériques interagissent avec les PLBP en permettant l'entrée du substrat dans le cytoplasme. Le transport est énergisé par l'hydrolyse de l'ATP réalisée par des ATP-ases cytoplasmiques associées aux perméases (voir **Fig.4**).

La perméase peut adopter deux conformations : ouverte vers le cytoplasme, mais fermée vers le périplasme ou fermée vers le cytoplasme, mais ouverte vers le périplasme. Le transport est permis grâce à des changements conformationnels provoqués par l'hydrolyse de l'ATP et transmis de l'ATP-ase vers la perméase et de celle-ci vers la PLBP. Lors de la liaison d'une PLBP chargée à la perméase, la conformation de la perméase est ouverte vers le périplasme, l'ATP est hydrolysé au moment de la liaison, ce qui permet le changement de conformation vers une conformation ouverte vers le cytoplasme en provoquant simultanément le largage du substrat par la PLBP et la séparation de celle-ci de la perméase. [182]

VI b Perméases ABC d'*E. coli* :

L'ensemble des opérons codant pour les transporteurs ABC chez *E. coli* K12, occupe près de 5% du génome et code en tout pour 57 transporteurs. C'est la plus large famille paralogue de gènes chez cette espèce bactérienne. Parmi les transporteurs encodés, 44 sont dépendants des PLBP. Tous ces transporteurs peuvent être subdivisés en dix familles distinctes par analyse bioinformatique. [298]

Parmi les transporteurs dont le rôle est connu, plusieurs interviennent dans le transport des ions métalliques. Ainsi le transport du fer, groupement hème et sidérophores est assuré par les transporteurs : Fec, Fep et Fhu. Le molybdène est importé par Mod, le nickel est importé par Nik, et le zinc est importé par Znu. Enfin, de nombreux transporteurs ABC d'*E. coli* n'ont pour l'instant pas de

rôle défini, ce qui laisse espérer l'identification d'autres transporteurs de métaux. [298] Il est aussi à noter que des transporteurs ABC additionnels peuvent être présents chez les souches pathogènes d'*E. coli*, dans quel cas ils pourraient être impliqués dans la virulence. Tel est le cas du transporteur Sit présent chez les souches ExPEC d'*E. coli*. [77]

VI c Importances des perméases ABC :

La proportion de l'information génétique occupée par des gènes codant pour les transporteurs ABC chez *E. coli*, démontre l'importance de ces transporteurs ABC pour la physiologie cellulaire bactérienne. Dans le cas des perméases d'import, l'importance est probablement expliquée par la capacité des transporteurs ABC d'accumuler des grandes quantités de soluté en le transportant dans la cellule contre le gradient de concentration. En effet, il semble que certains solutés peuvent être accumulés par les perméases ABC, même si leur concentration cellulaire est de 10^6 fois supérieure à celle de l'environnement. Il est à noter que dans le cas des transporteurs énergisés par le gradient chimiosmotique, ce facteur est de 10^3 et est donc mille fois inférieur à celui des transporteurs ABC. [299] Par conséquent, même dans un milieu très pauvre en soluté recherché, la bactérie pourra accumuler des quantités suffisantes du soluté recherché grâce à une perméase ABC appropriée. En outre, le facteur d'accumulation des perméases ABC permet de penser qu'en régulant leur expression la cellule bactérienne peut faire fluctuer les concentrations de soluté recherché, étant donné que l'éventail des concentrations couvertes par le facteur d'accumulation est très important.

De plus, les perméases ABC sont énergisées par l'hydrolyse de l'ATP (toujours présent dans une cellule bactérienne viable) et non pas par une autre source d'énergie telle qu'un gradient chimiosmotique. En effet, dans le cas des transporteurs de type Nramp (ou autres familles apparentées de transporteurs) le transport du soluté A contre le gradient de concentration est couplé à un transport simultané d'un autre soluté B (par exemple un proton dans le cas des transporteurs Nramp) selon son gradient des concentrations. [299] Par conséquent, les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques (MntH ou ZupT dans notre étude) dépendent fortement des conditions physicochimiques du milieu environnant et qui pourraient affecter les gradients du substrat cotransporté. Par contre, les perméases ABC n'ont besoin pour fonctionner que de l'ATP et sont donc moins dépendants des conditions physicochimiques d'un milieu. Il est donc possible qu'*in vivo*, les transporteurs ABC soient plus à même d'acquérir les solutés cibles que les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques. Par contre, les transporteurs ABC sont plus énergivores que les transporteurs à gradient chimiosmotique, car ils sont constitués de plusieurs protéines dont la synthèse demande plus d'énergie et nécessitent l'emploi de 2 ATP pour le transport d'un seul soluté cible.

VII Conclusion de la revue de la littérature:

Certains ions métalliques sont absolument indispensables pour le métabolisme cellulaire des eucaryotes autant que des procaryotes. Ces ions métalliques sont des éléments structuraux ou des cofacteurs enzymatiques des métalloprotéines et des métallo-enzymes cellulaires vitales. Bien qu'étant bénéfiques pour le métabolisme cellulaire en quantité appropriée ces métaux sont toxiques en excès, alors que d'autres métaux sont tout simplement toxiques et ne représentent aucun bénéfice pour les cellules.

L'ensemble des ions métalliques interagissant avec une cellule procaryote ou eucaryote peut être nommé métallome. Le métallome est un ensemble dynamique, en ce sens que sa composition varie en fonction des besoins cellulaires, mais aussi en fonction de la disponibilité des différents types des ions métalliques dans l'environnement. Le métallome est donc le produit d'une double contrainte : résultant des besoins de la cellule bactérienne en ions métalliques et des ressources de l'environnement dans lequel cette cellule bactérienne est placée. Cette double contrainte est surtout très présente pour les cellules bactériennes qui survivent dans des milieux aux caractéristiques physicochimiques très variables et parfois hostiles.

Le métabolisme cellulaire est impossible sans les cofacteurs, ou les éléments de structure protéique métalliques appropriés. En effet, des métallo-enzymes et des métalloprotéines de structure, indispensables à la survie de la cellule bactérienne, seraient inactivées par l'absence de ces ions métalliques. De même, ce métabolisme est grandement perturbé en présence des concentrations élevées d'ions métalliques toxiques, car des cofacteurs enzymatiques métalliques seraient remplacés par des ions toxiques inaptes à faciliter le catalyse enzymatique, des structures protéiques seraient dénaturées par la liaison des ions toxiques, ou encore des stress seraient provoqués par la présence de ces ions métalliques indésirables. La composition du métallome est donc d'une grande importance pour la physiologie cellulaire.

Les bactéries ont développé des mécanismes pour acquérir les métaux indispensables et se débarrasser des métaux toxiques. L'acquisition ou le rejet des ions métalliques se font par des transporteurs cellulaires spécifiques ayant une affinité plus ou moins marquée pour un nombre restreint de métaux. Les cellules ont aussi acquis, de par le processus de l'évolution, la capacité de contrôler la composition de leur métallome de façon à permettre la meilleure activité métabolique possible dans un environnement donné. Le contrôle du métallome se fait par l'utilisation des réseaux de régulateurs transcriptionnels, qui permettent d'intégrer les différents aspects de la gestion des métaux cellulaires : c'est-à-dire l'influx, le stockage et l'efflux des métaux en tenant compte des besoins cellulaires et des stresses que l'environnement impose à la cellule bactérienne.

Parmi les différents métaux utilisés par les cellules, trois se démarquent par leur importance, il s'agit du fer, du manganèse et du zinc. Dans le cadre de notre projet, nous avons choisi d'approfondir l'étude de la relation entre le transport de ces trois métaux et la capacité des souches ExPEC à causer des maladies. Ces métaux sont impliqués dans les divers aspects du métabolisme cellulaire autant chez l'hôte mammifère que chez les bactéries pathogènes pouvant infecter l'hôte. Un bref rappel des fonctions affectées chez la cellule bactérienne par les trois métaux à l'étude, est offert dans le tableau 2.

Tab.2 : Résumé succinct des principales fonctions cellulaires bactériennes aux quelles contribuent le zinc, le fer et le manganèse.

Métal	Métalloprotéines Métallo-enzymes	Fonctions dans la physiologie bactérienne
Zn	Protéines ribosomales	Stockage du zinc cellulaire
	Régulateurs transcriptionnels	Régulation de l'expression de l'information génétique
	Toutes les classes fonctionnelles des enzymes	Interviennent dans les différents sentiers métaboliques et couvrent l'ensemble du métabolisme.
Fe	Ferritine et bactérioferritine	Stockage du fer.
	Cytochromes de la chaîne respiratoire	Respiration.
	Réductases de nitrate	Métabolisme de l'azote.
	Enzymes de cycle de Krebs	Production de l'énergie et métabolisme central du carbone.
	Enzymes de la résistance au stress oxydatif.	Défense de la cellule bactérienne contre les effets délétères du stress oxydatif.
Mn	Phosphatases	Phosphorylation des lipides et protéines
	Enzymes du métabolisme central du carbone	Production de l'énergie et métabolisme central du carbone.
	Peptidases-P	Métabolisme des protéines
	Production des messagers secondaires dérivés du guanylate	Signalisation et régulation cellulaires
	Enzymes de résistance au stress oxydatif	Défense de la cellule bactérienne contre les effets délétères du stress oxydatif.

Pour les souches bactériennes virulentes, le milieu interne de l'organisme hôte n'est qu'un environnement comme un autre. De par l'évolution, ou le transfert horizontal de l'information

génétique, ces souches ont acquis des mécanismes qui leur permettent de survivre et de se multiplier dans le milieu interne de l'organisme hôte. Lors du développement du processus infectieux, une compétition pour les métaux se produit entre l'hôte et le pathogène. En effet, d'une part les bactéries requièrent des ions métalliques qu'elles puisent dans le milieu interne de l'organisme hôte et d'autre part des mécanismes spécifiques liés à l'immunité permettent d'appauvrir le milieu interne de l'organisme hôte en ions métalliques. C'est pour cela que certains transporteurs impliqués dans l'acquisition *in vivo* de ces métaux par les bactéries pathogènes, sont indispensables au développement de la maladie et que pour certains transporteurs pathospécifiques, la définition de facteur de virulence s'applique parfaitement.

Les bactéries pathogènes ont plus qu'un transporteur unique pour l'acquisition d'un métal donné, il y a donc redondance des fonctions de transport. Les différents transporteurs n'ont pas la même affinité pour un type d'ion métallique donné, ni la même efficacité pour l'acquisition d'un métal donné dans les différents environnements. Il apparaît que certains types de transporteurs sont plus importants pour la survie des bactéries *in vivo*. C'est en particulier le cas des transporteurs ABC des ions divalents de fer, manganèse et zinc. En effet, ces transporteurs (bien que très énergivores) ont une plus grande capacité d'accumuler le soluté cible que les transporteurs à gradient chimiosmotiques. De plus, il a été démontré que la perte de la fonction de ces transporteurs diminue la virulence des bactéries pathogènes. Ces transporteurs sont donc des cibles thérapeutiques potentielles pour le développement des nouveaux traitements bactéricides et les souches atténuées ayant perdu ces transporteurs, peuvent être potentiellement utilisées en tant que vaccins vivants atténués.

Les souches ExPEC causent de nombreux types d'infections chez l'homme et les animaux. À l'intérieur de l'organisme hôte ces souches se retrouvent dans un milieu appauvri en ions métalliques. Les cellules des souches ExPEC entrent en compétition avec les cellules de l'organisme hôte pour l'obtention des ions métalliques grâce à l'utilisation de transporteurs, dont certains sont importants pour la virulence. L'étude des transporteurs des cations métalliques de fer, zinc et manganèse pourrait donc fournir des connaissances permettant de lutter contre les différentes infections causées par les souches ExPEC chez l'humain et les animaux. Étant donné que rien n'était connu sur l'importance de ces transporteurs dans la virulence des souches ExPEC, nous avons entrepris leur étude. Les expériences que nous avons réalisées et les résultats obtenus lors de celles-ci, sont présentés dans les articles qui suivent la revue de la littérature que nous clôturons par la conclusion présentée ci-dessus.

VIII Publications: procédures expérimentales et résultats:

Article 1

Publié en mars 2006 dans la revue *Microbiology*.

Titre : L'homologue de SitABCD d'une souche *Escherichia coli* pathogène aviaire permet le transport du fer et manganèse et la résistance au peroxyde d'hydrogène.

Résumé : Nous avons identifié un opéron encodant un membre de la famille transporteurs des ions de métaux divalents à cassette de liaison à l'ATP (ABC), homologue de SitABCD de *Salmonella enterica*, chez la souche χ 7122 pathogène aviaire d'*Escherichia coli* (APEC). Les gènes *sitABCD* étaient situés sur le plasmide de virulence pAPEC-1 et étaient très similaires au niveau nucléotidique aux gènes *sitABCD* encodés sur le chromosome de *Shigella sp.* Une copie clonée de *sitABCD* a conféré une croissance accrue à une souche d'*E. coli* déficiente en sidérophores et cultivée en peptone liquide supplémentée avec le chélateur 2,2'-dipyridyle. La supplémentation en ions a démontré que l'augmentation de la croissance permise par Sit était due chez cette souche au transport du fer. L'accumulation de ^{55}Fe , ^{59}Fe ou ^{54}Mn par les souches d'*E. coli* K-12 déficientes en transport du fer (*aroB feoB*) ou manganèse (*mntH*) respectivement a démontré que SitABCD permettait un transport accru du fer et du manganèse. L'accumulation des isotopes et les expériences d'inhibition du transport ont démontré que chez la souche déficiente en transport du fer, SitABCD avait une affinité plus élevée pour le fer que pour le manganèse et le transport par SitABCD était plus efficace pour le fer ferreux. Des expériences similaires chez la souche déficiente en transport du manganèse ont montré que dans le contexte de cette souche, SitABCD avait une affinité plus élevée pour le manganèse que le fer. L'introduction des gènes *sitABCD* APEC chez un mutant *mntH* d'*E. coli* K-12 a aussi conféré une résistance aux effets bactéricides du peroxyde d'hydrogène. Les dérivées de la souche APEC χ 7122 ayant perdu le système de transport SitABCD ou MntH étaient aussi résistants au peroxyde d'hydrogène que la souche parentale sauvage, alors que le double mutant $\Delta\text{sit } \Delta\text{mntH}$ était plus sensible au peroxyde d'hydrogène. Pris ensemble, nos résultats démontrent que chez *E. coli*, SitABCD représente un transporteur de manganèse et du fer, qui en combinaison avec les autres systèmes de transport des ions pourrait contribuer à l'acquisition du fer, du manganèse et à la résistance au stress oxydatif.

A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide.

Running title: *E. coli* SitABCD transporter

Subject Category: Genes and Genomes

Mourad Sabri, Simon Léveillé, and Charles M. Dozois*

Institut National de la Recherche Scientifique, INRS-Institut Armand-Frappier, 531 boul. des Prairies,
Laval, Québec, H7V 1B7, Canada

***Correspondence:** Charles M. Dozois

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

Phone: 450-687-5010 (ext. 4221)

Fax: 450-686-5501

Abbreviations: ABC: ATP-binding cassette; APEC: avian pathogenic *E. coli*; AT: annealing temperature; CAS: chrome azurol S; DT: dilute tryptone; EMBOSS: European Molecular Biology Open Software Suite; ExPEC: extra-intestinal pathogenic *E. coli*; LB: Luria-Bertani broth; NB: nutrient broth; NCBI: National Center for Biotechnology Information

Abstract:

We have identified an operon encoding a member of the family of ATP-binding cassette (ABC), divalent metal ion transporters, homologous to *Salmonella enterica* SitABCD, in the avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain χ 7122. The *sitABCD* genes were located on the virulence plasmid pAPEC-1, and were highly similar at the nucleotide level to the chromosomally encoded *sitABCD* genes present in *Shigella* spp. A cloned copy of *sitABCD* conferred increased growth to a siderophore-deficient *E. coli* strain grown in nutrient broth supplemented with the chelator 2,2'-dipyridyl. Ion rescue demonstrated that Sit-mediated growth promotion of this strain was due to the transport of iron. SitABCD mediated increased transport of both iron and manganese as demonstrated by uptake of ^{55}Fe , ^{59}Fe or ^{54}Mn in *E. coli* K-12 strains deficient for the transport of iron (*aroB feoB*) and manganese (*mntH*) respectively. In the iron transport deficient strain, SitABCD demonstrated a greater affinity for iron than for manganese, and SitABCD-mediated transport was higher for ferrous iron as demonstrated by isotope uptake and transport inhibition studies. In the manganese transport-deficient strain, SitABCD demonstrated greater affinity for manganese than for iron, as demonstrated by isotope uptake and transport inhibition studies. Introduction of the APEC *sitABCD* genes into an *E. coli* K-12 *mntH* mutant also conferred increased resistance to the bactericidal effects of hydrogen peroxide. APEC strain χ 7122 derivatives lacking either a functional SitABCD or MntH transport system were as resistant to hydrogen peroxide as the wild-type strain, whereas a Δ *sit* Δ *mntH* double mutant was more sensitive to hydrogen peroxide. Overall, our results demonstrate that in *E. coli* SitABCD represents a manganese and iron transporter that, in combination with other ion transport systems, may contribute to acquisition of iron, manganese and resistance to oxidative stress.

INTRODUCTION

Pathogenic *E. coli* are divided into two major groups associated with either intestinal or extra-intestinal diseases [48, 300]. The intestinal pathotypes cause diarrhoea in humans and animals, whereas pathotypes associated with urinary tract infections, neonatal meningitis and septicaemia have been collectively termed extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) [48]. Pathogenic *E. coli* strains are also classified according to the host species they infect [301]. Avian pathogenic *E. coli* (APEC) cause colibacillosis, a general term used to encompass a number of extra-intestinal infections of poultry, including respiratory infection (airsacculitis), septicaemia, and cellulitis [49, 302]. APEC strain χ 7122 (078:K80:H9) has been used as a model strain to study molecular mechanisms of APEC pathogenicity [225, 303]. χ 7122 has several iron transport systems, including the aerobactin and salmochelin siderophore systems, which are encoded on a large virulence plasmid pAPEC-1 and are absent from non-pathogenic *E. coli* K-12. In addition, strain χ 7122 possesses the chromosome encoded enterobactin siderophore system and the Feo ferrous iron transporter. Siderophores mediate the acquisition of ferric (Fe^{3+}) iron by competing with the host iron-binding proteins. Other transporters such as FeoB transport ferrous (Fe^{2+}) iron directly from the environment [230].

In *E. coli* and most other bacteria iron is a cofactor of a number of essential metabolic enzymes [16]. Importantly, iron plays a role in protection against oxidative damage, as it is a component of the *sodB* encoded superoxide dismutase (FeSOD) and catalase enzymes which eliminate superoxide (O_2^-) and H_2O_2 respectively. However, excess iron levels in bacterial cells contribute to oxidative damage through the generation of free radicals [304].

The global regulator Fur, upon association with its co-repressor Fe^{2+} , represses transcription of genes encoding high-affinity iron transport systems and other proteins involved in iron metabolism and thus tightly controls iron homeostasis of the bacterial cell [16, 243]. Iron metabolism is co-ordinately regulated with the oxidative stress response, and *fur* expression is positively regulated by the oxidative

response regulators OxyR and SoxRS [305]. In addition to regulating genes associated with iron metabolism or transport, Fur also regulates the expression of genes required for manganese transport [236, 284] and the manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD), SodA [306]. Hence, control of both manganese and iron transport and iron- and manganese-dependent defence against oxidative stress are coordinated.

Manganese contributes to protection against oxidative stress, is a cofactor for a number of enzymes in bacteria and other organisms [20], and can also contribute directly to the catalytic detoxification of reactive oxygen species [307]. In the enterobacteria, two major types of manganese transporters have been identified; a proton-dependent Nramp-related transport system typified by MntH and an ATP-binding cassette (ABC) transporter typified by SitABCD [20, 204]. In addition to being regulated by iron levels and Fur, expression of these systems is also regulated by manganese levels and the regulator MntR [60, 284]. In *E. coli* and *Salmonella enterica* MntH functions as a proton-dependent divalent cation transporter that is highly selective for Mn^{2+} [20]. ABC transporters of divalent metal cations are widely distributed phylogenetically among bacteria [63]. They include SitABCD from *Salmonella enterica* and YfeABCD from *Yersinia pestis*. SitABCD and YfeABCD were initially identified as Fe^{2+} transporters [235, 308]. However, it has since been demonstrated that these transporters can also mediate the transport of Mn^{2+} [59, 236]. A Sit homolog from *Shigella flexneri* 2a has been characterised ([54], although the capacity of SitABCD homologues from either *Shigella* or *E. coli* to transport iron or manganese has not been investigated.

We have identified a SitABCD homologue in APEC strain χ 7122. Unlike other SitABCD and related transporters identified in the enterobacteria, which are encoded on the chromosome, the *sitABCD* genes in strain χ 7122 are encoded on the colicin-V type plasmid pAPEC-1. Herein, we characterised SitABCD by investigating its capacity to transport manganese and iron in *E. coli* K-12

mutants deficient in the transport of these cations. In addition, we determined the contribution of SitABCD to the resistance of *E. coli* strains to hydrogen peroxide.

METHODS

Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. In addition to strains described in Table 1, clinical isolates from different sources were used. Archetypal ExPEC reference strains CFT073 (O6:K2:H1), CP9 (O4:K54:H5), and RS218 (O18:K1:H7) from human infections were kindly provided by Dr. James R. Johnson (VA Medical Center, Minneapolis, MN, USA). Strain 536 (O6: K15: H31) was kindly provided by Prof. Jorg Hacker (Universität Würzburg, Würzburg, Germany). Strain EB1 (O8:K43) from a human wound infection was kindly provided by Dr. Ben Otto (Vrije Universiteit, Amsterdam, The Netherlands). APEC strains MT78 (O2:K1:H5), MT458 (O78:K80), and MT512 (O2:K1:H7) were kindly provided by Maryvonne Moulin-Schouleur (INRA, Tours, France). All strains were maintained in stock cultures at -80°C in 25% glycerol following overnight culture in Luria-Bertani (LB) broth (10 g yeast extract, 5 g tryptone, and 10 g NaCl per litre). Strains and clones were routinely grown in LB broth or on LB agar plates (15 g agar per litre). *E. coli* strain DH5 α was routinely used for plasmid cloning and recovery. Antibiotics were added as required at the following concentrations: ampicillin 100-200 $\mu\text{g ml}^{-1}$, kanamycin 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, chloramphenicol 30 $\mu\text{g ml}^{-1}$, nalidixic acid 15 $\mu\text{g ml}^{-1}$ and tetracycline 10 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

DNA and genetic manipulations. Standard methods were used for isolation of bacterial genomic DNA, DNA manipulation, and cloning [309]. Restriction enzymes and DNA ligase were purchased from New England Biolabs (NEB), Invitrogen, or Amersham-Pharmacia and used according to the suppliers' recommendations. Native plasmids from clinical isolates were extracted and analysed as described [310]. Recombinant plasmids, PCR products, and restriction fragments were purified using plasmid mini-prep, PCR clean-up, and gel extraction kits (Qiagen or Sigma) as recommended by the supplier.

PCR and DNA hybridization. *Taq* DNA polymerase (NEB) was used for routine DNA amplifications (<2 kb), and Elongase® (Invitrogen) was used for longer high-fidelity amplifications and cloning of genes. For amplification of products of up to 2 kb, 10 μl of a bacterial whole cell lysate was added to a PCR reaction

mixture of a final volume of 25 µl containing 6.25 pmol of each primer, 5 nmol of each dNTP, and 0.5 U of *Taq* polymerase in 1X buffer. The PCR conditions were as follows: 94 °C for 3 min; followed by annealing for 1 min as indicated, 72 °C for 1 min, and 94 °C for 1 min for 25 cycles; and a final extension at 72 °C for 10 min. For Southern blots, plasmid extracts or digested genomic DNA were separated by agarose gel electrophoresis and transferred to nylon membranes. A 663 bp DNA fragment was amplified from *E. coli* χ 7122 genomic DNA by using the *sitA* primer pair (CMD22: 5'-ccctgtaccagcgtactgg-3' and CMD23: 5'-cgcagggggcacaactgat-3' with an annealing temperature (AT) of 54 °C) and was labelled by using the PCR DIG Labelling Mix (Roche). Hybridization and detection of the hybridized fragments were performed using the Digoxigenin Detection Kit as recommended by the manufacturer (Roche).

Cloning of the *sitABCD* and *mntH* genes. A homologue of the SitABCD transporter of *Salmonella enterica* was identified in APEC strain MT512 (O2:K1) by DNA subtractive hybridization against the genome of the non-pathogenic avian *E. coli* strain EC79 (O2:K-) [311, 312]. Genes encoding homologues of SitABCD are also present in the genomes of uropathogenic *E. coli* CFT073 [71] and *Shigella flexneri* serotype 2a strains [313, 314]. Primers specific to *sitA* and *sitD* of *E. coli* and *S. flexneri* 2a were designed from the sequences available at Genbank. *sitA* specific primers (CMD22: 5'-ccctgtaccagcgtactgg-3' and CMD23: 5'-cgcagggggcacaactgat-3' used at an AT of 54 °C) and *sitD*-specific primers (CMD41: 5'-gcgtgtgtcaggagtagc-3' and CMD42: 5'-ctgtgcgctgctgctgctg-3' used at an AT of 52 °C) amplified fragments from the genomic DNA of strain χ 7122. The *sit*-specific primer pairs were used to screen a cosmid bank containing DNA inserts that hybridized with *E. coli* χ 7122 DNA that is absent from the genome of *E. coli* K-12 [303]. A cosmid, pCA6, which was positive for PCR amplification using the *sitA* and *sitD* primer pairs, was identified. A *Hind*III fragment containing the *sit* genes of χ 7122 was subcloned from pCA6 into pACYC184 generating plasmid pIJ28.

The *sit* genes from strain CFT073 were amplified from genomic DNA by PCR using primers CMD20: 5'-aaaagcttaagacgacaatcgctgga-3' (*Hind*III site underlined) and CMD21: 5'-ttgagctcggaataacgcttaccgtgtaa-3' (*Sac*I site underlined) at an AT of 57 °C and *Elongase*® DNA polymerase (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. The amplification product was cloned directly into pTOPO-XL (Invitrogen) resulting in plasmid pIJ4. A segment of pIJ4 containing the *sitABCD* genes was obtained following digestion with *Hind*III

and *SacI*. This fragment was cloned into the *HindIII* and *SacI* sites of pWSK29 resulting in plasmid pIJ5.

The *mntH* primer pair (CMD58: 5'-ggttaagcttccggtgcacattctatgtaa-3' and CMD59: 5'-ctaagcttcgtagggcggataaggcgtt-3' (*HindIII* sites underlined) at an AT of 64 °C) was used to amplify and clone the *mntH* gene from genomic DNA of strain χ 7122 by using the same strategy as above. Cloning of the *HindIII* digested PCR product containing the *mntH* gene and promoter region into the *HindIII* site of pACYC184 generated pIJ42.

Construction of *sitABCD* and *mntH* mutant strains. In order to construct an isogenic Δ *sitABCD::tetAR*(B) mutant of strain χ 7122 we used suicide vector-based allele replacement. Plasmid pIJ5 containing the *sitABCD* genes from strain CFT073 was digested with *PstI* resulting in removal of a section of the *sitABCD* operon spanning from nucleotide 149 of *sitA* to nucleotide 25 of *sitD*. A *PstI* fragment bearing a *tetAR*(B) cassette [78] was cloned into the *PstI* sites of the *PstI* digested pIJ5 plasmid resulting in pIJ43. A *BssHII* fragment of pIJ43 encompassing the Δ *sitABCD::tetAR* construct was ligated to the compatible *AscI* sites of suicide vector pMEG-375 resulting in plasmid pIJ44. pIJ44 was used to replace the *sitABCD* genes with a non-functional Δ *sitABCD::tetAR* region using *sacB*-mediated counterselection as described [78]. A derivative of χ 7122, strain QT205, was confirmed as a double-crossover recombinant in which the *sitABCD* region had been replaced by Δ *sitABCD::tetAR* following homologous recombination.

mntH null mutants of *E. coli* K-12 strain χ 289 and APEC strains χ 7122 and QT205 were generated by the bacteriophage λ red recombinase-mediated mutagenesis method [315]. The *mntHKO* primer pair (CMD43: 5'-ctatgttttagaggcacaagatgacgaactatcgcggttaggctggagctgcttc-3' and CMD44: 5'-tagtgccatgatgacgacgctcattcaactacaatcccatatgaatctctccttag-3' at an AT of 65 °C) was used to generate a kanamycin resistance gene cassette containing DNA fragment from the template plasmid pKD3. The PCR product was used to delete the *mntH* gene as described [315]. PCR amplification using the *mntH* primer pair (CMD58 and CMD59), which was used to clone the *mntH* gene, confirmed the *mntH* deletion mutations in strains QT99 (χ 289 Δ *mntH*), QT878 (χ 7122 Δ *mntH*), and QT1239 (χ 7122 Δ *mntH* Δ *sitABCD*).

DNA sequencing and analysis of the *sitABCD*-encoding region. The *sitABCD* operon and flanking DNA regions were sequenced from plasmid pIJ28 and from PCR amplified fragments of strain χ 7122 DNA.

Sequencing was achieved by generating derivatives of pIJ28 that contained the transposon Tn5seq1 [316]. The Tn5seq1 sequence contains SP6 and T7 primers flanking each end and facilitates bi-directional sequencing. In addition, custom primers were used to complete the sequence. DNA sequencing was done at the Genome Québec facility (McGill Univ., Montréal, QC, Canada). Putative open reading frames (ORFs) were identified using the ORF Finder program and similarity searches of the DNA sequence. Predicted ORFs were obtained using BLAST programs accessed from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Pairwise % identity/ % similarity of ORFs was determined using the Stretcher program available from the European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS) [317].

Siderophore production, growth assays, and ion-rescue experiments. Chrome azurol S (CAS) agar plates [318] were used to determine production of siderophores in the siderophore-negative *E. coli* strain 1017 containing cloned DNA from APEC strain χ 7122. Growth curves of the siderophore-negative *E. coli* K-12 strain 1017 containing cloned DNA from APEC strain χ 7122 were performed as described [319]. The growth assay medium was nutrient broth (NB) (Difco laboratories, Detroit, MI) supplemented with 0.5% (w/v) NaCl, thiamine ($1 \mu\text{g ml}^{-1}$), histidine ($22 \mu\text{g ml}^{-1}$) and $70 \mu\text{M}$ of the chelator 2,2'-dipyridyl (Sigma, St-Louis, MO). To minimize possible metal contamination, the medium was prepared in polypropylene bottles that were washed twice with distilled water, and bacterial cultures were grown in disposable plastic tubes. Bacterial growth was measured every hour by spectrophotometry (OD_{600}). For ion-rescue experiments we proceeded as for the growth assays, but the metal-restricted medium was supplemented with either $70 \mu\text{M}$ of 2,2'-dipyridyl or $140 \mu\text{M}$ of EDDA as chelator and $10 \mu\text{M}$ of either Mn^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} or Fe^{3+} as complementing ion. All experiments were performed in triplicate.

Transport of iron and manganese isotopes and isotope-uptake inhibition experiments. Isotope-uptake and isotope-uptake inhibition assays were performed using ^{54}Mn , ^{59}Fe , and ^{55}Fe isotopes purchased from Perkin Elmer®. For iron uptake experiments ferric iron, $^{55}\text{FeCl}_3$ was used. In addition, to determine ferrous iron uptake, the iron isotope was reduced to the ferrous state by addition of 100 mM ascorbate to the stock solution as described elsewhere [230]. Iron and manganese uptake experiments were based on a protocol modified from Silver and Kralovic [236, 320]. Briefly the strains were grown overnight in dilute tryptone (DT) broth. DT broth

comprised: Bacto™ tryptone (4 g L⁻¹) (Difco) supplemented with 0.25% (w/v) NaCl, 0.4% (w/v) glucose, thiamine (1 µg ml⁻¹), histidine (22 µg ml⁻¹) and aromatic amino acids (tryptophan, phenylalanine, and tyrosine) (20 µg ml⁻¹ each) with appropriate antibiotics. Cultures were adjusted to an OD₆₀₀ of 0.5, were centrifuged at 1600 g, and were washed twice with equal volumes of room temperature DT broth (pH 7.0). In 2 ml Eppendorf tubes, 1 ml of washed cells was centrifuged at 1600 g for 10 min and the bacterial pellets were suspended in DT medium containing isotope, ferric or ferrous ⁵⁵Fe or ferrous ⁵⁹Fe (to a final concentration of 100 nM) or ⁵⁴Mn (to a final concentration of 50 nM), and samples were left to stand for 3 minutes at room temperature. Samples were then centrifuged at 1600 g and cells were washed twice with isotope-free DT. A 2 ml volume of scintillation cocktail was added to the cells and scintillation was measured in a Wallac® Microbeta Trilux scintillation counter equipped with an Eppendorf tube adaptor plate (Perkin Elmer®). Samples were analyzed on the channels 5-810 for ⁵⁴Mn, 5-980 for ⁵⁹Fe and 5-750 for ⁵⁵Fe. The scintillation cocktail, Optiphase (Wallac®), was purchased from Perkin Elmer®. All experiments were done in triplicate. Values obtained were normalized with a positive control containing the isotope without cells and a negative control containing cells without isotope. For the isotope-uptake inhibition, the samples were prepared as for the isotope-uptake assays and ferrous ⁵⁹Fe, ferric ⁵⁵Fe or ⁵⁴Mn were used. The isotopes were mixed with from 0.01 µM to 100 µM of cold competing Fe²⁺, Fe³⁺ or Mn²⁺ ions, and uptake was measured. All results were presented as a percentage of total isotope uptake determined in the absence of added cold ions.

Hydrogen peroxide sensitivity assay. Sensitivity of bacterial cultures to hydrogen peroxide (H₂O₂) was performed by using an agar overlay diffusion method as described [56]. Briefly, overnight grown cultures were used to inoculate (1/100) fresh LB medium without antibiotics, and the resulting cultures were incubated until the OD₆₀₀ was 0.5. Then 100 µl of each culture were mixed with 3 ml of molten top agar and poured onto an LB agar plate. A 7-mm-diameter Whatman filter disk impregnated with 10 µl of 30.4% hydrogen peroxide (H₂O₂) was placed in the centre of the plate and plates were incubated overnight at 37°C. Following growth, the inhibition zone diameters were measured.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using the Prism 4.0b software package (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Statistical significance between two groups was established by unpaired t-test and comparison among three or more groups by one-way analysis of variance (ANOVA).

Nucleotide sequence accession number. The SitABCD encoding DNA region of pAPEC-1 from strain χ 7122 has been entered as GenBank nucleotide accession number AY598030. The *sitA* gene from *E. coli* CFT073 sequenced from plasmid pIJ4 (Table 1) has been entered as GenBank nucleotide accession number DQ256074.

RESULTS

The *sit* genes are plasmid-encoded in APEC strain χ 7122. APEC strain χ 7122 contains a large plasmid, pAPEC-1, that encodes virulence factors including the aerobactin and salmochelin siderophore systems and the temperature-sensitive haemagglutinin (Tsh) autotransporter [78, 225]. Strain χ 7274 is a pAPEC-1 cured attenuated derivative of strain χ 7122 [78]. Attempts to amplify *sit*-specific DNA by PCR in strain χ 7274 were negative, suggesting that the *sitABCD* genes are located on plasmid pAPEC-1 of strain χ 7122. This finding is in contrast to *E. coli* CFT073 and *Shigella flexneri* 2a strains, which each contain one chromosomal copy of *sitABCD* [71, 313, 314]. Southern blotting of plasmid DNA using a *sitA*-specific probe demonstrated that pAPEC-1 of strain χ 7122 contained the *sit* genes, whereas strain χ 7274, which had lost pAPEC-1, did not hybridize with the *sitA*-specific probe (Fig.1). Further, plasmids from three other APEC strains, *E. coli* strain EB1 isolated from a human wound abscess, and the prototype Colicin V plasmid pColV-K30 also hybridized to the *sitA* probe. By contrast archetype ExPEC strains CFT073, CP9, RS218, and 536 each contained a chromosome encoded copy of *sit* genes as demonstrated by hybridisation of the *sitA*-specific probe to total genomic DNA digested with either *Hind*III or *Sal*I (Fig.1). Further, digests from the total genomic DNA of strains MT78, MT458, and EB1 each demonstrated two DNA fragments that hybridised to the *sit* probe, suggesting that some *E. coli* strains contain a chromosomal as well as a plasmid-encoded copy of the *sit* genes.

Characterisation of the SitABCD-encoding region of strain χ 7122. A 10 094 bp section of pAPEC-1 encompassing the *sit* genes was sequenced (Fig. 2, Table 2). The predicted SitABCD proteins of strain χ 7122 (SitABCD *E. coli* χ 7122) exhibited the highest identity-similarity to SitABCD of *S. flexneri* 2a strain SA100 (Table 2). None of the genomic regions flanking *sit* genes from *E. coli* or *Shigella* strains identified in the DNA databases exhibited identity with the regions flanking the *sitABCD* genes from plasmid pAPEC-1. On pAPEC-1, a complete *IS1* element is located 5' of the *sit* operon. The 5' and 3' regions adjacent to the *sit* genes are identical

to a contiguous segment of *E. coli* plasmid p1658/97. Identity to the segment of p1658/97 in the 5' region of the *sit* genes includes the *IS1* element and ends exactly at the end of the *IS1* left repeat (position 1273 of the *sit* region) and the identity to p1658/97 sequence resumes 3' of the *sit* genes. The 3' region adjacent to *sitD* contains a 288 bp sequence exhibiting 93% identity to a *Tn1000*-like transposase encoding sequence, and this segment overlaps ORF1 described from plasmid p1658/97 (Fig. 2). Other ORFs 3' to the *sit* genes share identity at the protein level with part of a putative enolase, *Eno-2*, from *Pseudomonas syringae*, *CrcB* from *Nitrosomonas europaea*, *ShiF* and *IucA* (Table 2). *ShiF* is an ORF that is part of the aerobactin siderophore encoding pathogenicity islands present in *Shigella flexneri* 2a [321, 322] and *E. coli* CFT073 [71]. The first gene of the aerobactin operon, *iucA* is adjacent to *shiF* on pAPEC-1 (Fig. 2). When cosmid pCA6 or its subclone pIJ28 (*sitABCD*) were transferred to the *E. coli* siderophore-negative K-12 strain 1017, pCA6 conferred siderophore production to strain 1017, whereas pIJ28 was negative for the production of siderophores. PCR analysis demonstrated that in addition to the *sit* genes, pCA6 also contained genes encoding aerobactin siderophore synthesis (*iucABC*) and uptake (*iutA*) (data not shown). These results are in accordance with the sequencing data, which indicate that the *shiF* and *iucA* genes are adjacent to the *sit* operon (Fig. 2, Table 2).

The promoter region of *sitABCD* *E. coli* χ 7122 contains a potential operator sequence for the binding of the iron (II)-responsive Fur regulatory protein (Fig. 2). In addition, a region highly similar to the binding site of the manganese responsive regulator protein MntR was identified (Fig. 2). The potential Fur and MntR binding sites both overlap the predicted -10 to -35 region, suggesting that both iron and manganese levels are likely to influence regulation of *sit* gene expression. The predicted Fur- and MntR-binding regions were derived from the consensus sequences described by [323] and [284] respectively, and are also conserved in *PsitABCD* of *E. coli* CFT073 and in *S. flexneri* strains (data not shown; [54]).

The *sitABCD* *E. coli* χ 7122 genes are most similar to those of *S. flexneri* 2a strains 301 [314] and SA100 [54] (which are identical to each other). The 3450 bp region encompassing *sitABCD* *E. coli* χ 7122 contains 69 nucleotide differences with *sitABCD* *S. flexneri* 301 and 92 differences with *sitABCD* *E. coli* CFT073, whereas *sitABCD* *E. coli* CFT073 demonstrates 62 differences with *sitABCD* *S. flexneri* 301. The *sitA* gene from the complete genome sequence of strain CFT073 contains six deletions that result in a predicted truncated SitA precursor protein of 285 amino acids, compared to the predicted 304 residue products of *E. coli* χ 7122 and *Shigella* strains. Due to the discrepancies

between *sitA* sequences among strains we verified the sequence of the *sitA* gene of strain CFT073 from clone pIJ4 (Table 1). The DNA sequence we obtained lacked the 6 deletions that are present in the sequence submitted for *sitA* from the CFT073 genome (acc # AE016759) and encoded a predicted 304 amino acid precursor protein, but was otherwise identical.

The characterised systems currently identified in other bacteria that are most similar to SitABCD of *E. coli* χ 7122 are SitABCD of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium and Typhi and YfeABCD of *Yersinia pestis*. The *S. enterica sitA* gene product (Genbank accession number AAD41065) encodes the predicted periplasmic cation-binding protein and exhibits a % identity/similarity of 70/82 to SitA_{*E. coli* χ 7122}, whereas YfeA from *Y. pestis* (Genbank accession number CAC47605) demonstrates a % identity/similarity of 64/77 to SitA_{*E. coli* χ 7122}.

SitABCD confers Fur-regulated repression to an *aroB feoB* mutant of *E. coli* K-12 grown on iron-replete medium. To further investigate the role of SitABCD for the transport of iron in *E. coli*, we used *E. coli* K-12 H1771 as an indicator strain to determine *fur*-regulated control of iron acquisition on MacConkey-lactose agar supplemented with either 50 μ M of FeSO₄ or 50 μ M of 2, 2'-dipyridyl. Strain H1771 lacks both siderophore-mediated (Fe³⁺) and FeoB-mediated (Fe²⁺) transport systems and contains a Fur regulated *fhuF:: λ placMu53* fusion. Due to a reduced ability to obtain iron, the Fur regulated *fhuF-lacZYA* fusion in this strain remains derepressed even on MacConkey-lactose plates containing added iron [230]. Introduction of pIJ28 to strain H1771 resulted in repression of *fhuF-lacZYA* expression and production of white colonies on MacConkey-lactose containing 50 μ M Fe²⁺, whereas strain H1771 produced red colonies on MacConkey-lactose containing either 50 μ M Fe²⁺ or 50 μ M of 2,2'-dipyridyl. These results suggest that SitABCD conferred increased iron transport to strain H1771 in iron-supplemented medium and this resulted in the formation of Fur-Fe²⁺ complexes and repression of the *fhuF-lacZYA* fusion.

SitABCD promotes the growth of an *E. coli* K-12 enterobactin-deficient strain. The capacity of *sit* genes to promote the growth of the siderophore-negative strain 1017 in NB containing 70 μ M of the chelator 2'2'-dipyridyl (NB-DIP) was assessed. The hourly growth of strain 1017 that contained the *sit* genes (pIJ28), the aerobactin-encoding genes (pABN1), or a vector control (pACYC184) in NB-DIP was determined. Strain 1017

containing pIJ28 (*sitABCD*_{*E. coli* χ 7122}) grew well and at a rate similar to that of strain 1017 containing pABN1 (aerobactin system). By contrast, strain 1017 transformed with pACYC184 (vector control for plasmid pIJ28) exhibited poor growth (Fig. 3). Introduction of the pIJ5 (*sitABCD*_{*E. coli* CFT073}) also complemented the growth defect of strain 1017 as effectively as did pIJ28 (data not shown). These results indicate that introduction of the SitABCD system alone effectively complements the growth defect of strain 1017 in NB-DIP.

SitABCD promotes growth of strain 1017 by compensating for an iron deficit. To determine if the limited growth of strain 1017 in NB-DIP was due primarily to iron starvation and whether iron acquisition by SitABCD compensated for this poor growth, we investigated the effect of addition of metal cations to the growth of strain 1017 with or without *sitABCD*_{*E. coli* χ 7122}. Ferrous or ferric iron, manganese, or zinc were added to NB supplemented with either 70 μ M of 2, 2 dipyridyl or 140 μ M of EDDA, and growth of strain 1017 (pACYC184) was determined. Following overnight culture in either NB-DIP or NB-EDDA only ferrous or ferric iron could complement the growth deficit of strain 1017 (pACYC184) in a significant manner (80%), whereas manganese complemented the growth defect only partially (40%) and zinc did not improve growth (data not shown). The effect of addition of metals on the hourly growth of strain 1017 containing pIJ28 (*sitABCD*_{*E. coli* χ 7122}) in NB-DIP is presented in Fig. 4 and clearly demonstrates the effect of addition of iron compared to manganese or zinc on growth. Further, introduction of the Sit system to 1017 increased growth to 80% in NB-DIP supplemented with iron, as compared to NB without chelator, within 6 hours, whereas it took over 10 hours to reach a similar growth level by strain 1017 (pACYC184) (data not shown). These results suggest SitABCD contributes to improved growth of strain 1017 by compensating for an iron deficit.

SitABCD of *E. coli* χ 7122 mediates transport of iron and manganese. Since *sitABCD*_{*E. coli* χ 7122} conferred restored growth and Fur-mediated gene regulation to iron transport-deficient *E. coli* mutants, and since homologues of this system are characterised manganese and iron transporters [59, 236], we investigated the capacity of *SitABCD*_{*E. coli* χ 7122} to transport iron and manganese. SitABCD mediated the transport of ferrous iron and manganese under the conditions used for the assay (see Table 3). Under non-reducing conditions, in which iron is predominantly in the ferric state, the mean transport of iron by H1771 containing pIJ28 (*sitABCD*_{*E. coli* χ 7122}) was not statistically different ($P=0.111$), a mean increase of 1597 ± 783.6 c.p.m. compared to the control

strain H1771 (pACYC184) (Table 3). By contrast, when iron was treated with 100 mM ascorbate, to reduce iron to the ferrous state, plasmid pIJ28 (*sitABCD* *E. coli* χ 7122) conferred a significant increase in iron uptake, a mean increase of 3008 c.p.m. compared to H1771 (pACYC184) (P= 0.001) (Table 3). Despite the increase in iron transport mediated by SitABCD in strain H1771, the level of iron uptake observed was considerably less than transport by the Aro⁺ Feo⁺ *E. coli* K-12 strain χ 289, which was 3.57-fold higher and 2.56-fold higher than H1771 (pIJ28) under non-reduced and reduced conditions respectively.

Manganese uptake in the *mntH* mutant strain QT99 containing the vector control pACYC184 was significantly reduced (P=0.008) compared to that of the isogenic parent strain χ 289 (pACYC184), which exhibited a 1.63-fold higher mean uptake. Introduction of pIJ28 (*sitABCD*) to the *mntH* mutant strain QT99, conferred a statistically significant (P=0.01) 3.18-fold uptake of ⁵⁴Mn²⁺ compared to the vector control. Complementation of QT99 with plasmid pIJ42 (*mntH*) resulted in a ⁵⁴Mn²⁺ uptake that was 4.81-fold higher than QT99 containing pACYC184 (P=0.006) (Table 3). Hence, *sitABCD* cloned on vector pACYC184 effectively increased manganese transport by a *mntH* mutant K-12 strain, but not as effectively as re-introduction of a functional *mntH* allele on the same vector. Taken together, results demonstrate that a cloned copy of the *sitABCD* genes from APEC strain χ 7122 is able to complement mutants impaired in either iron or manganese transport function, and suggest that SitABCD_{*E. coli* χ 7122} mediates transport of both ferrous iron and manganese under the conditions used for the assays.

SitABCD affinities for iron and manganese are dependent of the strain background. To investigate the relative affinity of SitABCD from APEC strain χ 7122 for iron or manganese we conducted isotope-transport inhibition assays by addition of competing cold ions to iron or manganese isotopes during transport assays. Ferrous ⁵⁹Fe or ferric ⁵⁵Fe uptake by SitABCD was investigated in the iron-transport deficient strain H1771 (*aro/feo*), and ⁵⁴Mn uptake by SitABCD was investigated in the manganese-transport deficient strain QT99 (*mntH*) in the presence of increasing concentrations of Fe²⁺, Fe³⁺ or Mn²⁺ cations (Fig. 5). The apparent affinity or inhibition constants were determined as the concentration of cold cation required to inhibit 50% of the isotope uptake. In strain H1771, the apparent affinity for Fe²⁺ was 0.9 μ M and for Fe³⁺ it was 3.2 μ M. For strain QT99 the apparent affinity for Mn²⁺ was 4 μ M. For strain H1771, ⁵⁹Fe²⁺ uptake was more inhibited by Fe³⁺ (2.5 μ M)

than by Mn^{2+} (5 μM), in the same strain $^{55}\text{Fe}^{3+}$ uptake was more inhibited by Fe^{2+} (0.7 μM) and was less inhibited by Mn^{2+} (20 μM). In QT99 $^{54}\text{Mn}^{2+}$ uptake was better inhibited by Fe^{2+} (7 μM) and only poorly inhibited by Fe^{3+} (13 μM). Strains QT99 and H1771 differ in their native functional iron or manganese uptake systems. Strain QT99 is deficient in manganese transport, whereas H1771 is deficient in iron transport. Thus, the observed differences in SitABCD substrate specificity in these two strains are likely due to intrinsic differences in Mn and Fe transport.

SitABCD confers resistance to hydrogen peroxide. To determine whether the SitABCD transporter contributes to resistance to hydrogen peroxide (H_2O_2), we introduced pIJ28 (*sitABCD*) into strain QT99, the *mntH* null mutant strain of *E. coli* K-12. Strain QT99 was more sensitive to H_2O_2 than the isogenic parent strain χ 289, whereas introduction of either plasmid pIJ28 (*sitABCD*) or pIJ42 (*mntH*) resulted in a regain in resistance to H_2O_2 , which was similar to that of wild-type strain χ 289 (Fig. 6a). Analysis of variance of the means indicated that growth inhibition zones generated by H_2O_2 were significantly different among the *mntH* mutant strain and the mutant complemented with either *sitABCD* or *mntH* ($P=0.0312$). By contrast, differences in growth inhibition zones were not significant among the wild-type strain and QT99 complemented with either pIJ28 (*sitABCD*) or pIJ42 (*mntH*) ($P=0.0788$). The wild-type pathogenic *E. coli* strain χ 7122 did not demonstrate a significant difference in resistance to H_2O_2 when compared to wild-type K-12 strain χ 289 (Fig. 6b). In addition, strains QT205 (χ 7122 Δ *sitABCD*) and QT878 (χ 7122 Δ *mntH*) were as resistant to H_2O_2 as wild-type APEC strain χ 7122. However, the Δ *sitABCD* Δ *mntH* of strain χ 7122 (QT1278) was more sensitive to H_2O_2 than APEC strain χ 7122 (Fig. 6b). These results indicate that *sitABCD* contributes to resistance to H_2O_2 in *E. coli* K-12 that lacks a functional MntH transporter. However, deletion of *sitABCD* genes from APEC strain χ 7122 does not cause an appreciable difference in resistance to H_2O_2 and the loss of both the SitABCD and MntH systems is necessary to render APEC strain χ 7122 sensitive to H_2O_2 .

DISCUSSION

Presence of *sitABCD* genes on the plasmids and genomes of *E. coli* and *Shigella* spp. We have identified a homologue of the SitABCD transport system that is encoded by an operon located on the colicin V-type plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* strain χ 7122. In addition, we demonstrated that *sitABCD* is also encoded

by large plasmids in other pathogenic *E. coli* strains and that *sit* genes are also present on the reference colicin V plasmid pColV-K30, as well as on the genomes of certain strains (Fig. 1). Previous reports have described *sit* homologues that are located on the genomes of *Shigella flexneri* 2a strains [54, 313, 314] and ExPEC strain CFT073 [71]. Similarly, operons of the related systems such as *sitABCD*_{Salmonella enterica} [235] and *yfeABCD* in *Y. pestis* [308] are located on the chromosome. In addition, the presence of plasmid located *sit* sequences in other *E. coli* strains has also been reported [311, 312]. The SitABCD system represents yet another metal sequestering system that is encoded by genes located on ColV-type plasmids as well as the chromosomes of certain *E. coli* and *Shigella* strains. Other known metal transporters present on ColV-type or other conjugative plasmids in *E. coli* include the aerobactin and salmochelin siderophore systems encoded by the *iucABCDiutA* genes and *iroBCDEN* genes respectively [225, 324-326]. Thus ColV-type plasmids commonly carry genes encoding transporters important for the acquisition of metallic cations, particularly iron. In addition, both the aerobactin and salmochelin encoding operons are localized on the chromosomes of certain pathogenic *E. coli* or *Shigella* strains [321, 322, 327, 328], further attesting to the presence of these systems on either plasmids or pathogenicity islands.

Iron and manganese transport. In this report we have demonstrated the capacity of *sitABCD* from an APEC strain to function as a manganese and iron transporter. By using *E. coli* K-12 strains deficient in either transport of iron (*ent* or *aroB feoB*) or manganese (*mntH*), we investigated whether a cloned copy of *sitABCD* from APEC strain χ 7122 could compensate for mutations in these transport systems. Introduction of the *sitABCD* genes resulted in a significant regain in growth of the *ent* mutant strain 1017 in NB containing chelators (either 2, 2-dipyridyl or EDDA). The growth increase due to the presence of SitABCD was as marked as that seen after introduction of the aerobactin siderophore system (Fig. 3). Ion-rescue experiments, demonstrated that only iron was able to complement the growth defect of strain 1017 (*ent*-) to a high level (80% of the growth yield in medium without chelator) and that in the presence of pIJ28 (*sitABCD*) growth was faster (6 hours compared to more than 10 hours in the absence of *sitABCD*). Addition of manganese partially restored the growth of strain 1017 (*ent*-) (40% maximum growth increase) whereas zinc did not contribute to any discernable growth increase. These results suggest that lack of iron and not manganese or zinc was largely responsible for the growth-deficit of the strain 1017. This conclusion is reinforced by the fact that aerobactin, which is an iron-specific siderophore

was equally able to compensate the growth of strain 1017 in NB-DIP (Fig. 3). Hence, increased growth of the *E. coli* K-12 *ent* mutant strain 1017 containing *sitABCD* was likely due to a greater capacity to obtain iron and suggests a role for SitABCD *E. coli* χ 7122 as an iron transporter. These findings are in accordance with previous results demonstrating that SitABCD homologues from other bacterial species may function as iron transporters [59].

In the *aroB feoB* mutant strain H1771, *sitABCD* conferred a significant increase in uptake of ^{55}Fe and ^{59}Fe under reduced conditions, suggesting it may function as a ferrous iron transporter (Table 3). However, the levels of iron uptake observed in strain H1771 containing *sitABCD* *E. coli* χ 7122 were significantly lower when compared to the *E. coli* K-12 control strain containing the functional endogenous iron transport systems, FeoB and enterobactin (Table 3). Taken together, under our assay conditions, these results suggest that despite demonstrating a lower efficiency in iron uptake compared to the endogenous systems present in *E. coli* K-12, SitABCD is nevertheless able to compensate for iron transport deficiencies in *E. coli* K-12 and confer sufficient iron acquisition for restoration of growth under iron-limiting conditions.

Introduction of the *sitABCD* *E. coli* χ 7122 genes to an *E. coli* K-12 *mntH* mutant effectively restored manganese transport. In fact, when cloned copies of either *sitABCD* *E. coli* χ 7122 or *mntH* were introduced to the *mntH* mutant, manganese transport levels were greater than that of the wild-type parent (Table 3). This increased transport is most likely due to a plasmid copy number effect. In our studies, the first ^{54}Mn uptake assay was conducted at pH 7.0. In subsequent ^{54}Mn uptake assays done at acid to alkaline conditions ranging from pH 5 to pH 9, we observed that *mntH* mutant strain QT99 complemented with *mntH* (pIJ42) more effectively transported manganese under acid conditions (pH 5-6), whereas complementation with *sitABCD* *E. coli* χ 7122 (pIJ28) demonstrated increased manganese uptake at alkali pH (pH 8-9) (Sabri and Dozois, unpublished results). These results were similar to those observed for *Salmonella enterica* which demonstrated that SitABCD *Salmonella enterica* mediated ^{54}Mn uptake most effectively at alkaline pH [236]. SitABCD *Salmonella enterica* has also been shown to be more specific for transport of manganese than iron [20]. The YfeABC from *Y. pestis* was shown to mediate both manganese and iron uptake although no preferential uptake of either of these metals was established [59].

SitABCD and related systems are members of the Mn-Zn-Fe transport family (TC 3.A. 1.15) based on bioinformatics analysis (Claverys 2001; Saier, 1999), and these transporters have been shown to mediate uptake of iron or manganese in *Y. pestis* [59]. For SitABCD_{*Shigella flexneri*} no isotope uptake or isotope-uptake-inhibition experiments were performed, although the authors demonstrated an iron- and manganese-dependent regulation of *sitABCD*_{*Shigella flexneri*} [54, 329]. To determine if SitABCD exhibits a preference for uptake of iron or manganese we conducted isotope uptake and inhibition assays using ferric iron, ferrous iron, or manganese. Since zinc did not demonstrate any growth rescue to strain 1017 pIJ28 (*sitABCD*) in NB containing chelators it was not tested for ion inhibition. Results indicated that in a strain impaired for the transport of iron, SitABCD *E. coli* χ 7122 demonstrated a higher affinity for iron than for manganese and confirmed that SitABCD displayed a higher affinity for ferrous iron than for ferric iron (Fig. 5). By contrast, when uptake and inhibition experiments were done in a strain impaired for manganese transport, SitABCD *E. coli* χ 7122 transported manganese with more affinity than iron. The differences observed in ion transport affinities between the two strains are possibly due to the influence of other ion transport systems present in these strains which may affect both availability or uptake of competing cold ions. In the iron transport impaired strain H1771 (*aro*, *feo*), the MntH manganese transporter is functional and may compete with the Sit system for uptake of Mn²⁺ ions which could reduce the levels of cold Mn²⁺ ions available for the ⁵⁵Fe or ⁵⁹Fe uptake inhibition, thus resulting in lower apparent inhibition constants for manganese. Similarly in the manganese transport impaired strain QT99 (*mntH*) functional enterobactin and Feo transport systems may have influenced the Fe²⁺ and Fe³⁺ apparent inhibition constants. It is noteworthy that previous SitABCD_{*Salmonella enterica*} transport affinity studies by Kehres *et al.* were done in strains which had functional siderophore and Feo systems, which may have lead to the consequent finding that SitABCD _{*Salmonella enterica*} exhibited a considerably lower affinity for iron than for manganese [20]. Ion transport studies with YfeABC_{*Yersinia pestis*} used strains that contained functional MntH and Feo homologues [59]. It is therefore likely that some discrepancies observed in the transport specificity of Sit and related transporters that have been reported may be at least partially explained by differences in strain backgrounds as well as potential functional differences in the metal transporters themselves.

The apparent affinities of uptake for Fe²⁺, Fe³⁺ and Mn²⁺ indicated that under our assay conditions SitABCD *E. coli* χ 7122 transported ferrous iron with the highest affinity (0.9 μ M), followed by ferric iron (3.2 μ M)

and manganese (4 μM). In this regard, our studies are the first to demonstrate a preference for ferrous iron uptake by a SitABCD transport system. This observation was determined by comparison of Sit mediated ^{55}Fe uptake under reducing (Fe^{+2}) versus non-reducing (Fe^{+3}) conditions (Table 3) as well as by comparison of the uptake of ^{59}Fe (II) and ^{55}Fe (III) isotopes and inhibition with cold Fe (II) or Fe (III) ions (Fig. 5). The role of SitABCD as both an iron and manganese transporter is further supported by the improved growth under conditions of iron deficit and resistance to hydrogen peroxide phenotypes conferred to *E. coli* K-12 strains that were deficient in iron or manganese transport respectively.

Protection against oxidative stress and resistance to H_2O_2 : The ability to obtain manganese in bacteria contributes to detoxification of free radicals and protection against oxidative damage from agents such as hydrogen peroxide (H_2O_2) [20, 307]. In our studies, increased sensitivity to H_2O_2 correlated with a decreased capacity to transport manganese. The *E. coli* K-12 *mntH* mutant was more sensitive to hydrogen peroxide than its wild-type parent strain, and complementation of the *mntH* mutant with either *sitABCD* or *mntH* restored resistance to H_2O_2 (Fig. 6a). Therefore *sitABCD* was shown to effectively compensate for the loss of MntH by restoring transport of manganese as well as resistance to H_2O_2 in a K-12 *E. coli* strain. By contrast, in APEC strain $\chi 7122$ deletion of either *sitABCD* or *mntH* alone did not render it more sensitive to H_2O_2 (Fig. 6b). This suggested that the presence of either MntH or SitABCD sufficed for maintaining resistance to H_2O_2 in the absence of the other transporter. In support of this, the double $\Delta\textit{sitABCD} \Delta\textit{mntH}$ mutant derivative of strain $\chi 7122$ (QT1239) demonstrated a significant loss of resistance to H_2O_2 toxicity. These results suggest that under our assay conditions either SitABCD- or MntH-mediated manganese import systems were sufficient for maintaining a similar level of H_2O_2 resistance and that each of the two systems is able to compensate for the loss of function of the other transporter in the APEC strain. These findings also support a potential combined role for the SitABCD and MntH transporters for the virulence of APEC and perhaps other extra-intestinal pathogenic *E. coli*.

Role of SitABCD for virulence. Inactivation of *sitABCD* alone in APEC strain $\chi 7122$ had no appreciable effect on its sensitivity to H_2O_2 (Fig. 6). In line with this, following infection with the $\Delta\textit{sitABCD}$ mutant QT205, chickens developed lesions of airsacculitis, pericarditis, and perihepatitis that were as severe as those observed in

birds infected with the wild-type pathogenic parent strain χ 7122 (Caza, Curtiss, and Dozois, unpublished results). In the extra-intestinal tissues of infected chickens a combination of iron transport systems are needed for full virulence and the APEC *sit* derivative QT205 retains functional siderophores and other iron and manganese transporters such as FeoB and MntH. Taken together, these results suggest that other iron and/or manganese transport systems present in APEC strain χ 7122 may compensate for the loss of a functional Sit transport system and provide sufficient transport for growth in iron-restricted medium and resistance to H₂O₂. Recently, by using signature-tagged mutagenesis (STM), the Sit transporter was identified as a potential virulence factor in an APEC O2 strain in experimentally infected chickens (Li et al. 2005). Since STM-based studies involve co-infections with pools of mutants, in such studies it is not possible to establish if specific mutants are less able to generate lesions during infection. The potential contribution of SitABCD for the virulence of APEC strains may also differ among different APEC strains or serogroups since the pathogenic mechanisms of different strains have been shown to differ. For instance an APEC O2 strain demonstrated uptake and survival within avian phagocytes, whereas APEC O78 strain χ 7122 has been shown to avoid phagocytosis by avian heterophils or macrophages (Mellata *et al.*, 2003). In *E. coli*, SitABCD encoding genes are associated with clinical strains isolated from extra-intestinal infections from poultry and human urinary tract infections [311, 312]. Recently, transcriptome analysis of uropathogenic *E. coli* strain CFT073 indicated that *sit* genes were highly upregulated in the urine of infected mice (Snyder *et al.* 2004), further supporting a potential role for the Sit system during infection. Further virulence studies will be required to assess the individual and cumulative roles of SitABCD and other iron and manganese transport systems for the virulence of APEC and other pathogenic *E. coli* strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Jorg Hacker, Klaus Hantke, James R. Johnson, Maryvonne Moulin-Schouleur, Ben Otto, and Robert D. Perry for kindly supplying *E. coli* strains. We acknowledge Sébastien Houle for technical assistance and France Daigle for critical reading of the manuscript. Funding for this research was provided by the Natural Sciences and Engineering Council (NSERC) of Canada, the Canada Foundation for Innovation (CFI) and a Canada Research Chair (CRC). S. L. was the recipient of a « Fonds de la recherche en santé Québec » (FRSQ) scholarship. M. S. was the recipient of a Fondation Armand-Frappier scholarship.

REFERENCES

- 1 **Andrews, S. C., Robinson, A. K. & Rodriguez-Quinones, F. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.
- 2 **Bearden, S. W., Staggs, T. M. & Perry, R. D. (1998).** An ABC transporter system of *Yersinia pestis* allows utilization of chelated iron by *Escherichia coli* SAB11. *J Bacteriol* **180**, 1135-1147.
- 3 **Bearden, S. W. & Perry, R. D. (1999).** The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol* **32**, 403-414.
- 4 **Bindereif, A. & Neilands, J. B. (1983).** Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid ColV. *J Bacteriol* **153**, 1111-1113.
- 5 **Boyer, E., Bergevin, I., Malo, D., Gros, P. & Cellier, M. F. (2002).** Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**, 6032-6042.
- 6 **Brown, P. K. & Curtiss, R., III (1996).** Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 11149-11154.
- 7 **Cellier, M. F., Bergevin, I., Boyer, E. & Richer, E. (2001).** Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters. *Trends Genet* **17**, 365-370.
- 8 **Chang, A. C. & Cohen, S. N. (1978).** Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**, 1141-1156.
- 9 **Claverys, J. P. (2001).** A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res Microbiol* **152**, 231-243.
- 10 **Daskaleros, P. A., Stoebner, J. A. & Payne, S. M. (1991).** Iron uptake in *Plesiomonas shigelloides*: cloning of the genes for the heme-iron uptake system. *Infect Immun* **59**, 2706-2711.
- 11 **Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. (2000).** One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 6640-6645.
- 12 **de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. & Neilands, J. B. (1987).** Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor. *J Bacteriol* **169**, 2624-2630.
- 13 **Dho-Moulin, M. & Fairbrother, J. M. (1999).** Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**, 299-316.
- 14 **Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E. Z., Funfstuck, R. & Hacker, J. (2001).** S-Fimbria-encoding determinant *sfa(I)* is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infect Immun* **69**, 4248-4256.
- 15 **Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Brée, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C. & Curtiss, R., III (2000).** Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infect Immun* **68**, 4145-4154.

- 16 Dozois, C. M., Daigle, F. & Curtiss, R., III (2003). Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 247-252.
- 17 Gilson, L., Mahanty, H. K. & Kolter, R. (1987). Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity. *J Bacteriol* **169**, 2466-2470.
- 18 Gong, S., Bearden, S. W., Geoffroy, V. A., Fetherston, J. D. & Perry, R. D. (2001). Characterization of the *Yersinia pestis* Yfu ABC inorganic iron transport system. *Infect Immun* **69**, 2829-2837.
- 19 Gyles, C. L. (1994). *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Wallingford, England CAB International, 1994.
- 20 Horsburgh, M. J., Wharton, S. J., Karavolos, M. & Foster, S. J. (2002). Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol* **10**, 496-501.
- 21 Imlay, J. (2003). Pathways of oxidative damage. *Ann Rev Microbiol* **57**, 395-418.
- 22 Jin, Q., Yuan, Z., Xu, J. & other authors (2002). Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* **30**, 4432-4441.
- 23 Johnson, J. R. & Russo, T. A. (2002). Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad *E. coli*". *J Lab Clin Med* **139**, 155-162.
- 24 Kado, C. I. & Liu, S. T. (1981). Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. *J Bacteriol* **145**, 1365-1373.
- 25 Kammler, M., Schon, C. & Hantke, K. (1993). Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**, 6212-6219.
- 26 Kehres, D. G., Janakiraman, A., Slauch, J. M. & Maguire, M. E. (2002a). Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium *mntH* transcription by H₂O₂, Fe(2+), and Mn(2+). *J Bacteriol* **184**, 3151-3158.
- 27 Kehres, D. G., Janakiraman, A., Slauch, J. M. & Maguire, M. E. (2002b). SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**, 3159-3166.
- 28 Kehres, D. G. & Maguire, M. E. (2003). Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 263-290.
- 29 La Ragione, R. M. & Woodward, M. J. (2002). Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**, 27-35.
- 30 McHugh, J. P., Rodriguez-Quinones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D. A., Poole, R. K., Cooper, C. E. & Andrews, S. C. (2003). Global iron-dependent gene regulation in *Escherichia coli*. A new mechanism for iron homeostasis. *J Biol Chem* **278**, 29478-29486.
- 31 Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss, R., III, Lehoux, B. & Fairbrother, J. M. (2003). Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**, 494-503.
- 32 Moss, J. E., Cardozo, T. J., Zychlinsky, A. & Groisman, E. A. (1999). The *selC*-associated SHI-2 pathogenicity island of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* **33**, 74-83.

- 33 Nag, D. K., Huang, H. V. & Berg, D. E. (1988). Bidirectional chain-termination nucleotide sequencing: transposon Tn5seq1 as a mobile source of primer sites. *Gene* **64**, 135-145.
- 34 Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201.
- 35 Patzer, S. I. & Hantke, K. (2001). Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the *mntH* gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **183**, 4806-4813.
- 36 Provence, D. L. & Curtiss, R., III (1992). Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. *Infect Immun* **60**, 4460-4467.
- 37 Rice, P., Longden, I. & Bleasby, A. (2000). EMBL: The European molecular biology open software suite. *Trends in Genetics* **16**, 276-277.
- 38 Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K. & Nolan, L. K. (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**, 2097-2110.
- 39 Runyen-Janecky, L. J., Reeves, S. A., Gonzales, E. G. & Payne, S. M. (2003). Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition *in vitro* and in cultured cells. *Infect Immun* **71**, 1919-1928.
- 40 Saier, M. H., Jr. (1999). A functional-phylogenetic system for the classification of transport proteins. *J Cell Biochem Suppl* **32-33**, 84-94.
- 41 Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Ed. edn. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 42 Schouler, C., Koffmann, F., Amory, C., Leroy-Setrin, S. & Moulin-Schouleur, M. (2004). Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. *Microbiol-Sgm* **150**, 2973-2984.
- 43 Schwyn, B. & Neilands, J. B. (1987). Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores. *Anal Biochem* **160**, 47-56.
- 44 Silver, S. & Kralovic, M. L. (1969). Manganese accumulation by *Escherichia coli*: evidence for a specific transport system. *Biochem Biophys Res Commun* **34**, 640-645.
- 45 Snyder, J. A., Haugen, B. J., Buckles, E. L., Lockett, C. V., Johnson, D. E., Donnenberg, M. S., Welch, R. A. & Mobley, H. L. (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* **72**, 6373-6381
- 46 Sorsa, L. J., Dufke, S., Heesemann, J. & Schubert, S. (2003). Characterization of an *iroBCDEN* gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic *Escherichia coli*: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor. *Infect Immun* **71**, 3285-3293.
- 47 Tardat, B. & Touati, D. (1993). Iron and oxygen regulation of *Escherichia coli* MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcA for binding to DNA. *Mol Microbiol* **9**, 53-63.
- 48 Vokes, S. A., Reeves, S. A., Torres, A. G. & Payne, S. M. (1999). The aerobactin iron transport system genes in *Shigella flexneri* are present within a pathogenicity island. *Mol Microbiol* **33**, 63-73.

- 49 Wang, R. F. & Kushner, S. R. (1991). Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in *Escherichia coli*. *Gene* **100**, 195-199.
- 50 Warner, P. J., Williams, P. H., Bindereif, A. & Neilands, J. B. (1981). ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **33**, 540-545.
- 51 Waters, V. L. & Crosa, J. H. (1991). Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* **55**, 437-450.
- 52 Wei, J., Goldberg, M. B., Burland, V. & other authors (2003). Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun* **71**, 2775-2786.
- 53 Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., III & other authors (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 17020-17024.
- 54 Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D. & Storz, G. (1999). OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J Bacteriol* **181**, 4639-4643.
- 55 Zhou, D., Hardt, W. D. & Galan, J. E. (1999). *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**, 1974-1981.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids

Bacterial strain or plasmid	Relevant characteristics*	Reference or source
Bacterial strains		
CFT073	Human uropathogenic <i>E. coli</i> O6:H1:K ⁺	[330]
χ7122	APEC O78:K80:H9, <i>gyrA</i> Nal ^R	[331]
χ7274	χ7122 ΔpAPEC-1	[78]
QT205	χ7122 Δ <i>sitABCD</i> :: <i>tetAR</i> , Tc ^R	This study
QT878	χ7122 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i> , Km ^R	This study
QT1239	QT205 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i> , Tc ^R , Km ^R	This study
<i>E. coli</i> K-12		
1017	HB101 <i>ent</i> ::Tn5, Km ^R	[332]
χ289	W1485 F' λ <i>glnV44</i>	[303]
DH5α	F' λ φ80 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Bethesda Research Laboratories
H1771	MC4100 <i>aroB feoB7 shuF</i> ::λ <i>plac</i> Mu, Km ^R	(Kammler <i>et al.</i> , 1993)
QT99	χ289 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i> Km ^R	This study
Plasmids		
pABN1	Encodes aerobactin system, Ap ^R	[333]
pACYC184	p15A replicon, Cm ^R , Tc ^R	[334]
pCA6	Cosmid containing <i>sit</i> genes from <i>E. coli</i> χ7122	This study
pColV-K30	Native colicin V encoding reference plasmid	[335]
pIJ4	pTOPO-XL:: <i>sitABCD</i> from CFT073	This study
pIJ5	pWSK29:: <i>sitABCD</i> cloned <i>Hind</i> III fragment from pIJ4, Km ^R	This study
pIJ28	8 kb <i>Hind</i> III fragment containing <i>sitABCD</i> from χ7122 cloned into pACYC184, Cm ^R	This study
pIJ42	pACYC184:: <i>mntH</i> cloned PCR product from χ7122, Cm ^R	This study
pIJ43	<i>tetAR</i> (B) <i>Pst</i> I fragment cloned into <i>Pst</i> I sites of pIJ05, Km ^R	This study
pIJ44	<i>Bss</i> HII fragment from pIJ43 cloned into <i>Asc</i> I sites of pMEG-375. Cm ^R , Ap ^R	This study
pMEG-375	<i>SacRB mobRP4 oriR6K</i> , Cm ^R , Ap ^R	Megan Health, St. Louis, MO
pTOPO-XL	PCR cloning vector	In vitrogen
pWSK29	pSC101 replicon, multicloning site., Km ^R	[336]

* Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Nal, nalidixic acid; Tc, tetracycline

TABLE 2. Summary of ORFs within the SitABCD encoding region of pAPEC-1 and homologies to other sequences

ORF or sequence	Position (bp)*	Product length (aa)	% GC content	Homology (%identity/%similarity)	Function	Region	Accession number†
ImpB†	3>341	112	50	ImpB (100) <i>E. coli</i> plasmid p1658/97	UV protection component	9>341	AAO49619
InsB	521<1024	167	54	InsB (100) <i>E. coli</i> plasmid p1658/97	IS1 transposase component	Full length	AAO49620
InsA	943<1218	91	53	InsA (100) <i>E. coli</i> plasmid p1658/97	IS1 transposase component	Full length	AAO49621
SitA	1574>2488	304	48	SitA (98) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Periplasmic binding protein	Full length	AAM95574
SitB	2488>3315	275	52	SitB (98/99) <i>Shigella flexneri</i> 2a	ATP-binding component	Full length	AAM95575
SitC	3312>4169	285	52	SitC (99) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Inner membrane component	Full length	AAM95576
SitD	4166>5023	285	49	SitD (96/98) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Inner membrane component	Full length	AAM95577
ORF1	5391< 5654	87	49	Hypothetical (100) <i>E. coli</i> plasmid p1658/97	unknown	5391<5654	AAO49622
ORF2	5492>5926	144	47	Eno-2 (69/85) <i>Pseudomonas syringae</i>	Putative enolase	5514>5921	NP_794367
ORF3	6268>6648	126	42	CrcB (52/72) <i>Nitrosomonas europaea</i>	Putative role in chromosome condensation	Full length	CAD85615
ShiF	7029>8221	397	56	ShiF (89/93) <i>Shigella flexneri</i> 2a	Putative permease	Full length	AAN82076
IucA	8357>10084	575	54	IucA (98/98) <i>E. coli</i> CFT073 <i>E. coli</i> pColV-K30	Aerobactin synthesis	Full length	X76100

* Numbers correspond to nucleotides in Genbank accession number AY598030

† Genbank accession number

Table 3. Sit-mediated metal isotope uptake in *mntH* and *aro feo* *E. coli* K-12 strains.

Strains	Radioactivity (CPM)*
	⁵⁴ Mn ²⁺
QT99 (<i>mntH</i>) pACYC184	291 ± 25
QT99 (<i>mntH</i>) pIJ28 (pACYC184:: <i>sitABCD</i>)	923 ± 139 [†]
QT99 (<i>mntH</i>) pIJ42 (pACYC184:: <i>mntH</i>)	1399 ± 206 [†]
χ289 (K-12 WT) pACYC184	474 ± 27 [†]
	⁵⁵ Fe ³⁺ (non-reduced)
H1771 (<i>aro feo</i>) pACYC184	4388 ± 359
H1771 (<i>aro feo</i>) pIJ28 (pACYC184:: <i>sitABCD</i>)	5985 ± 697 [‡]
χ289 (K-12 WT) pACYC184	21371 ± 500 [§]
	⁵⁵ Fe ²⁺ (reduced)
H1771 (<i>aro feo</i>) pACYC184	5205 ± 134
H1771 (<i>aro feo</i>) pIJ28 (pACYC184:: <i>sitABCD</i>)	8213 ± 314 [§]
χ289 (K-12 WT) pACYC184	21022 ± 2009 [§]

* Mean value in CPM ± standard error of the mean (n=3)

[†] Significant difference compared to *mntH* strain QT99 (P ≤ 0.01)

[‡] No significant difference compared to *aro feo* strain H1771 (P = 0.11)

[§] Significant difference compared to H1771 *aro feo* mutant (P ≤ 0.001)

Figures and Legends

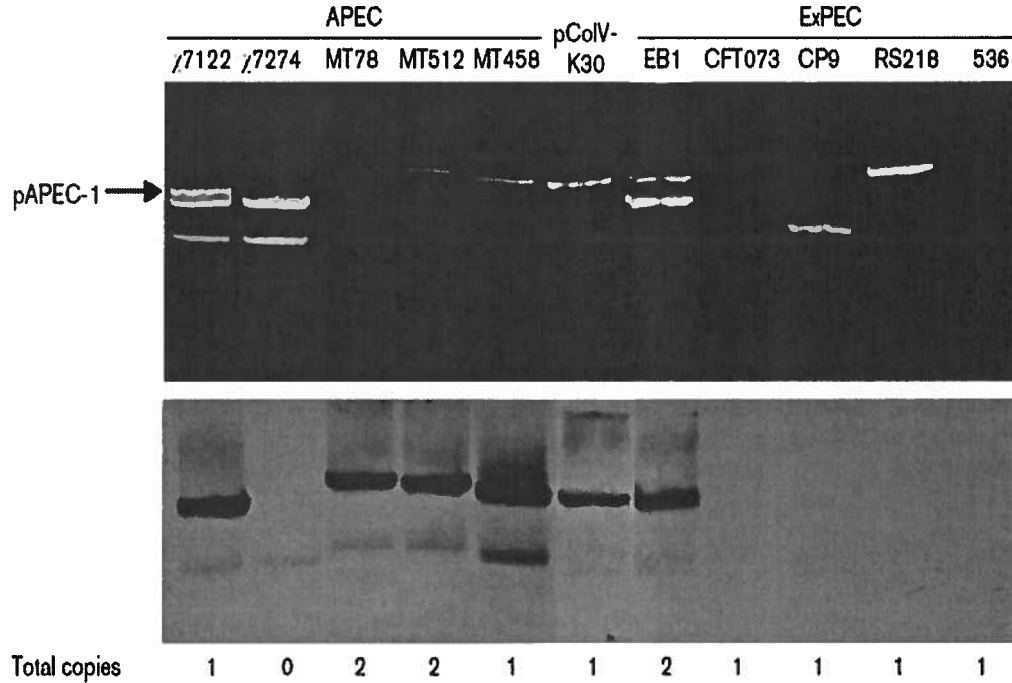


Fig. 1. Localisation of *sit* genes to either large plasmids or the chromosomes of *Escherichia coli* strains. The source of the strains as either avian pathogenic *E. coli* (APEC) or extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) from human infections is indicated at the top of the figure. Strains corresponding to each plasmid extract are indicated. Plasmid pColV-K30 is the Colicin-V reference plasmid that was extracted from an *E. coli* K-12 strain. Strain χ 7274 is a derivative of APEC strain χ 7122 which has lost the pAPEC-1 plasmid. **Upper panel :** Visualisation of native plasmids present in *E. coli* strains by ethidium bromide staining. Plasmid pAPEC-1 of APEC strain χ 7122 is indicated with an arrow on the left. **Lower panel :** Southern hybridisation of the same plasmid samples as above using a *sitA*-specific probe. Numbers at the bottom of the figure indicate the total number of copies that hybridised with the *sit*-specific probe on Southern blot of total genomic DNA digested with *Hind*III or *Sal*I.

Sabri et al. Figure 2

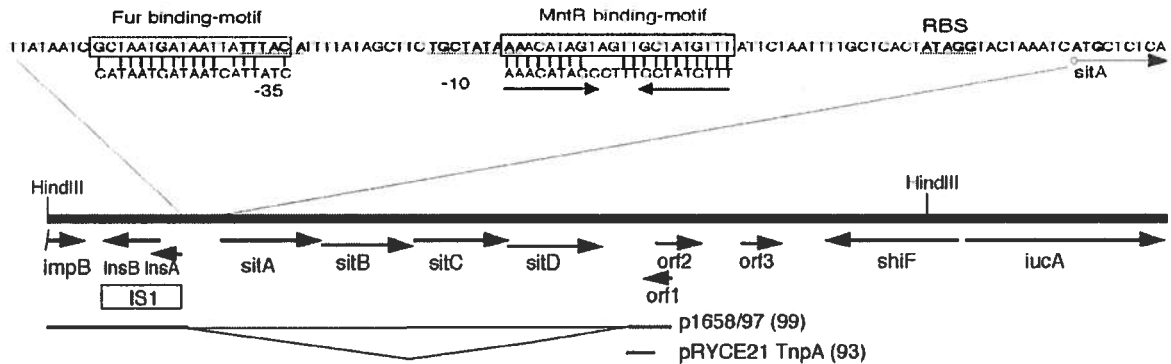


Fig. 2. Organisation and analysis of the *sitABCD*-encompassing region from plasmid pAPEC-1 of avian pathogenic *E. coli* strain χ 7122. The DNA fragment which was cloned to generate plasmid pIJ28 is indicated by the *Hind*III sites. Solid arrows below the sequence length indicate predicted open-reading frames. Horizontal lines below the sequence length represent plasmid DNA sequences sharing high identity to the corresponding regions. The percent nucleotide identities of the regions are indicated in parentheses. The triangle indicates a specific gap in the sequence of plasmid p1658/97 corresponding to the region that encodes *sitABCD* on pAPEC-1. Genbank accession numbers for p1685/97 and pRYCE 21 TnpA are AF550679 and AY598759 respectively. The sequence upstream of the *sit* genes contains motifs that correspond to binding sites for the Fur and MntR regulatory proteins. The putative Fur and MntR binding sites are indicated as boxed regions. Matches to the consensus binding motifs are illustrated with vertical lines. The inverted repeat motif in the MntR binding sequence is illustrated with arrows pointed in opposite directions. The putative -35 and -10 regions are shaded and underlined, and a putative ribosome-binding site (RBS) is indicated. The start of the *sitA* gene is indicated with an open-circled arrow, and the ATG start codon is indicated in bold. Consensus sequences for regulatory proteins Fur and MntR are derived from references [323] and [284] respectively.

Sabri et al. Figure 3

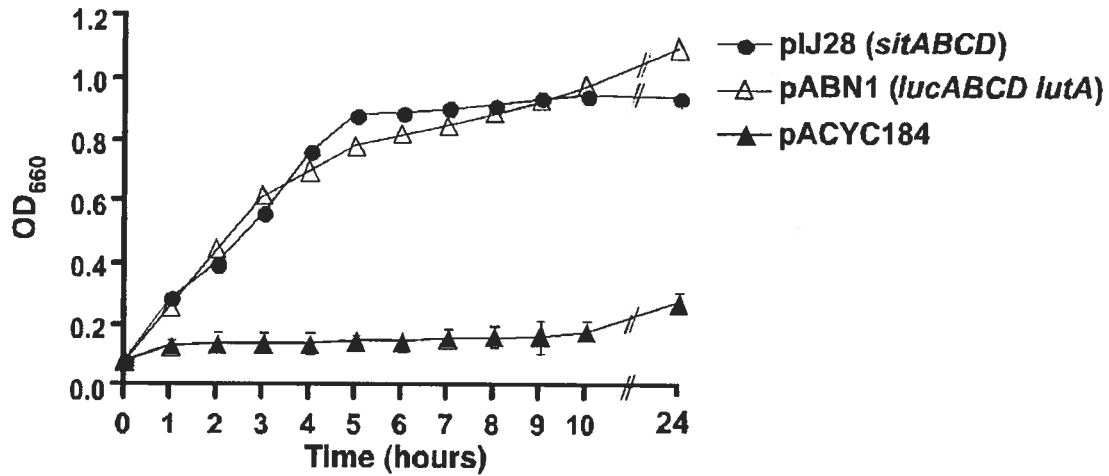


Fig. 3. Growth of *E. coli* K-12 strain 1017 (*ent*) containing plasmids pACYC184 (▲), pIJ28 (●) or pABN1 (△) in NB medium containing 75 μM 2,2 dipyridyl at 37°C. pACYC184 is the vector for pIJ28 and serves as a negative control. pIJ28 encodes the *sitABCD* genes. pABN1 encodes the aerobactin gene cluster and serves as a positive control. Results represent the mean values ± the standard error of the means for three independent experiments.

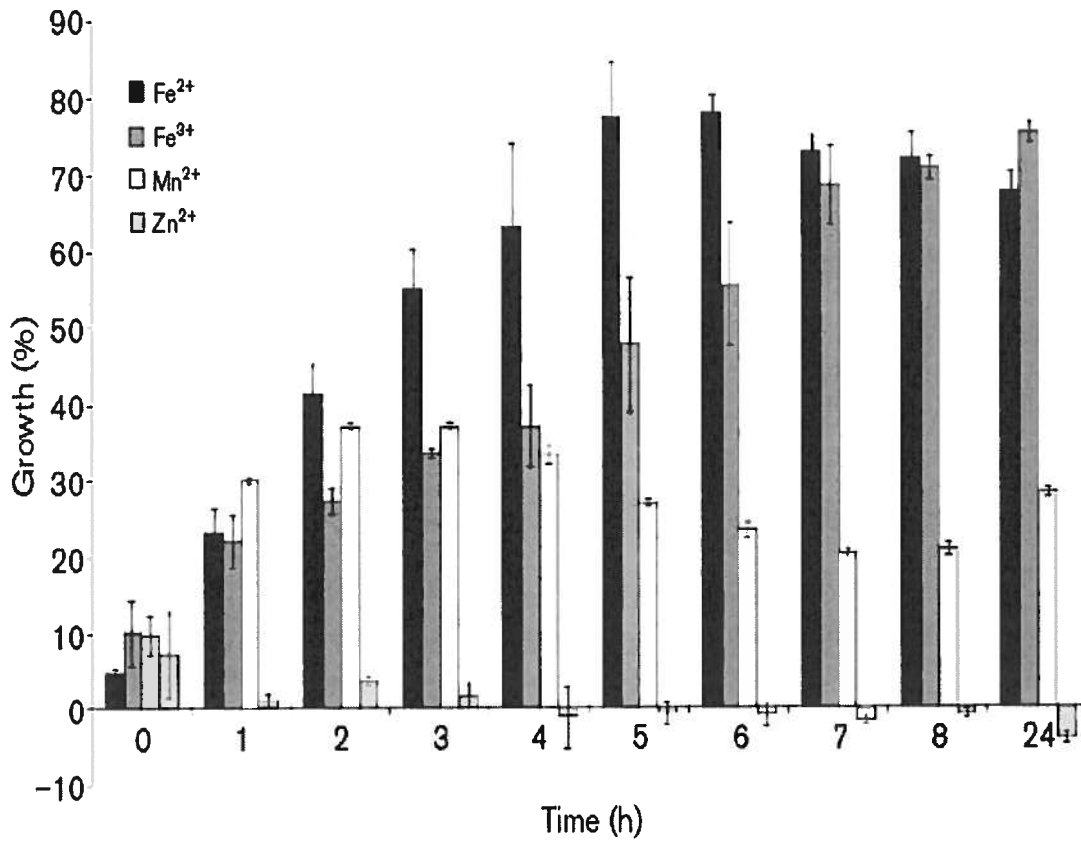


Fig. 4. Growth rescue of the siderophore-deficient strain 1017 (*ent*), carrying pIJ28 (*sitABCD*), in NB medium supplemented with 70 μ M of 2,2-dipyridyl and 10 μ M of either Fe²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺ or Zn²⁺. Growth is indicated as the percentage of equivalent growth of the strain grown in NB medium without chelator.

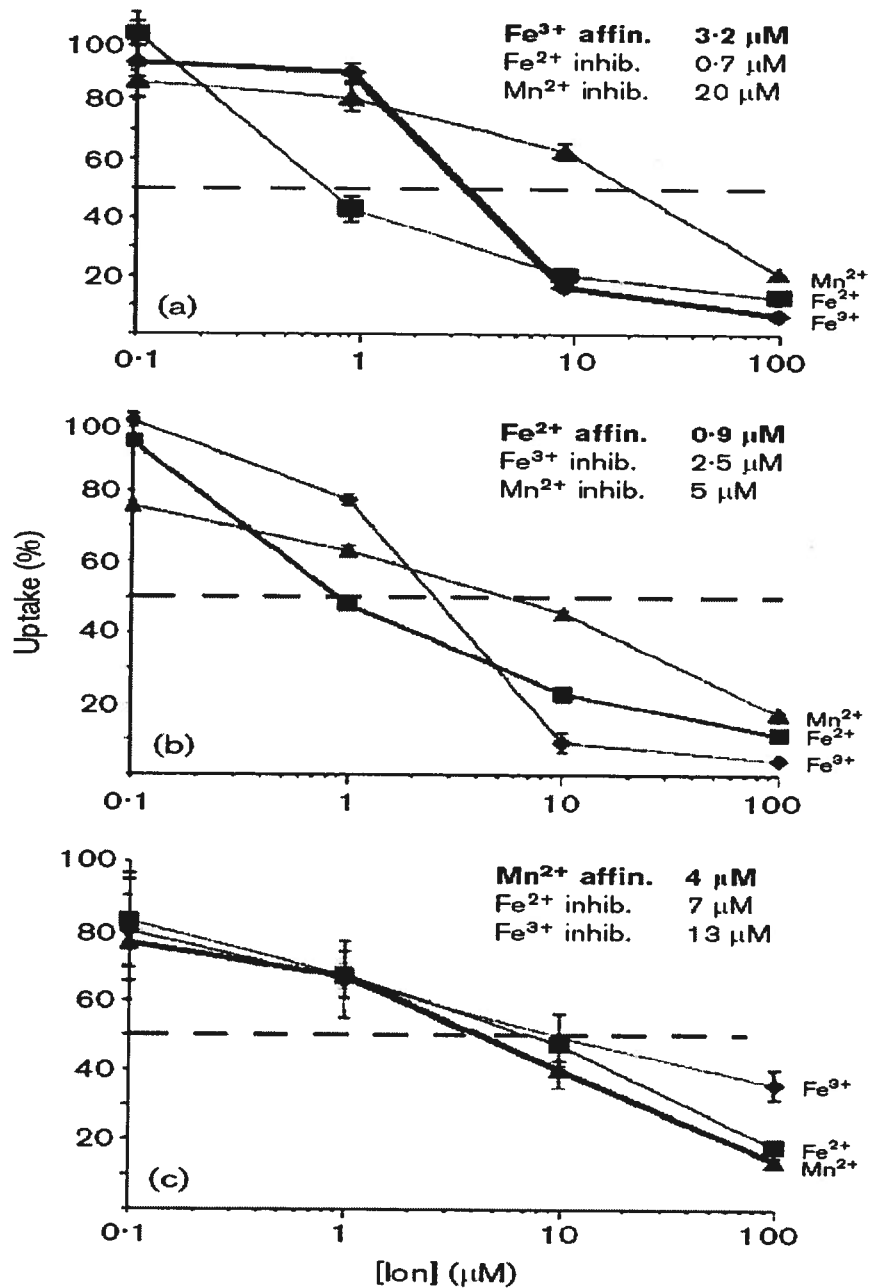


Fig. 5. Uptake inhibition for $^{55}\text{Fe}^{3+}$ (A) and $^{59}\text{Fe}^{2+}$ (B) in iron transport-deficient *E. coli* K-12 strain H1771 (*aro feo*) carrying plasmid pIJ28 (*sitABCD*) and $^{54}\text{Mn}^{2+}$ (C) in manganese transport-deficient *E. coli* K-12 strain QT99 (*mntH*) carrying plasmid pIJ28 (*sitABCD*). Affinities for each ion are indicated in bold text and with thick lines in each of the graphs.

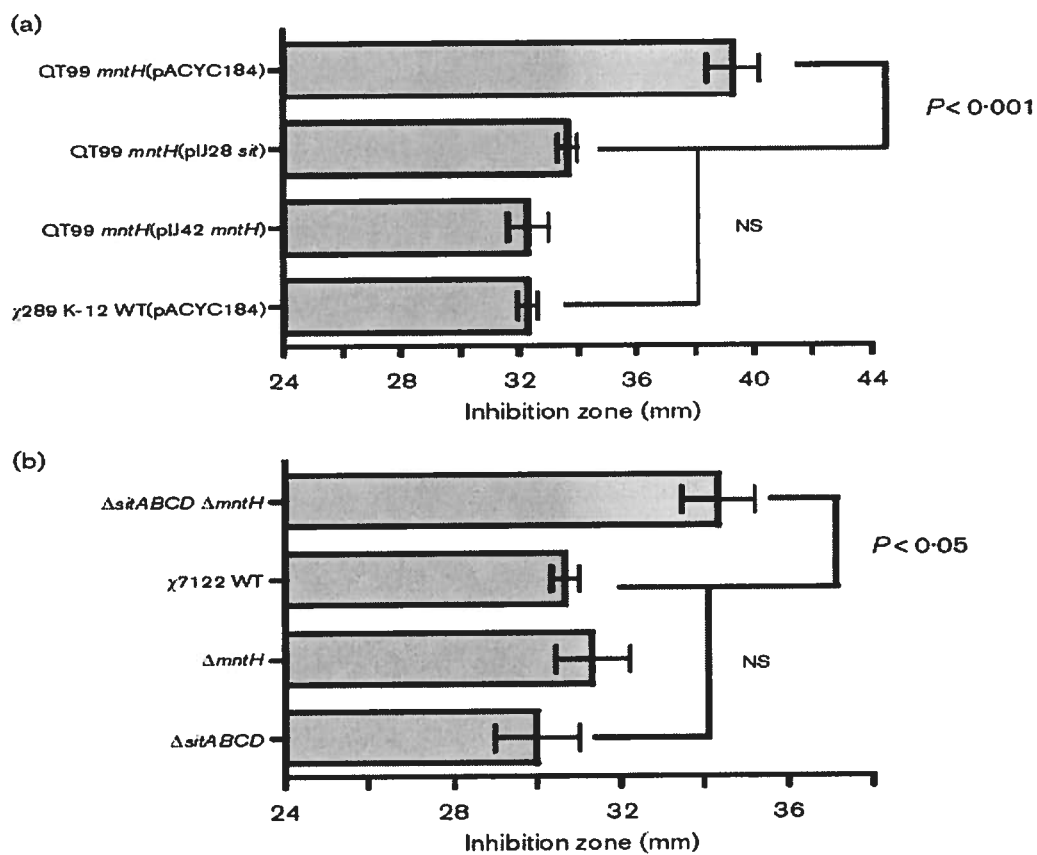


Fig. 6.

Resistance to hydrogen peroxide (H_2O_2). *E. coli* K-12 strains (A) or APEC strain χ 7122 and derivatives (B) with or without functional MntH and/or SitABCD transport systems were seeded onto agar plates and subjected to H_2O_2 placed on sterile filter discs. Differences in resistance are indicated as the diameter of the inhibition zone of a culture following overnight growth. APEC strains used were wild-type (WT) χ 7122 and isogenic mutants QT205 (Δ *sitABCD*), QT878 (Δ *mntH*), and QT1239 (Δ *sitABCD* Δ *mntH*).

Article 2

Publié en février 2008 dans la revue *Infection and Immunity*.

Titre: Contribution des transporteurs de métaux SitABCD, MntH et FeoB à la virulence d'une souche pathogène aviaire d'*Escherichia coli* (APEC) O78.

Résumé : Les rôles des transporteurs des métaux SitABCD, MntH, FeoB dans la virulence de la souche O78 APEC χ 7122, ont été évalués en utilisant des mutants isogéniques lors de l'infection expérimentale dans le modèle aviaire. Dans le modèle de monoinfection, la souche Δsit a démontré une colonisation réduite par rapport à la souche χ 7122 dans les poumons, le foie et la rate. La complémentation de la souche Δsit a restauré la virulence. Lors des co-infections, comparativement à la souche APEC virulente, la souche Δsit a démontré une réduction moyenne d'un facteur de 50, 126 et 25 dans la colonisation des poumons, du foie et de la rate respectivement. Une souche $\Delta mntH\Delta sit$ a été encore plus atténuée, démontrant une persistance réduite dans le sang, et une colonisation moyenne réduite d'un facteur 1400, 954, et 83 dans les poumons, le foie et la rate respectivement. Lors des co-infections, la souche $\Delta feoB\Delta sit$ a démontré une persistance réduite dans le sang, mais une colonisation accrue du foie. Les souches $\Delta mntH$, $\Delta feoB$, et $\Delta feoB\Delta mntH$ étaient aussi virulentes que la souche de type sauvage dans les deux modèles d'infection. Nous avons testé les souches quant à leur sensibilité agents générant du stress oxydatif. La souche $\Delta mntH\Delta sit$ a été la plus sensible et a été significativement plus sensible au peroxyde d'hydrogène, plumbagine et paraquat. Les séquences de l'opéron *sit* étaient fortement associées aux APEC et ExPEC humaines comparativement au isolats commensaux et diarrhéogènes d'*E. coli*. Les analyses génomiques comparatives ont aussi démontré que les séquences *sit* sont encodées sur les plasmides conjugatifs ou associées avec des éléments de phage et ont probablement été acquises parmi les *E. coli* pathogènes et *Shigella spp.* par des événements génétiques distincts. Pris ensemble ces résultats démontrent que SitABCD contribue à la virulence et ensemble avec MntH, à la résistance accrue au stress oxydatif.

Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) O78 strain

Running title: SitABCD contributes to APEC O78 virulence

Mourad Sabri¹, Mélissa Caza¹, Julie Proulx¹, Maria H. Lymberopoulos¹, Annie Brée², Maryvonne Moulin-Schouleur², Roy Curtiss III^{3,4}, and Charles M. Dozois^{1*}

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

² INRA - Centre de Tours - Infectiologie Animale et Santé Publique UR1282,
37380 Nouzilly, France

³ Center for Infectious Diseases, The Biodesign Institute. Arizona State University, Tempe,
AZ, 85287 U. S. A.

⁴ Department of Biology, Washington University, St. Louis, MO, U.S.A. 63130

*Corresponding Author:

Charles M. Dozois

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, CANADA H7V 1B7

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

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

Abstract:

The roles of SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters for virulence of APEC O78 strain χ 7122 were assessed using isogenic mutants in chicken infection models. In a single-strain infection model, compared to χ 7122, the Δsit strain demonstrated reduced colonization of the lungs, liver, and spleen. Complementation of the Δsit strain restored virulence. In a co-infection model, compared to the virulent APEC strain, the Δsit strain demonstrated a mean 50-fold, 126-fold, and 25-fold decrease in colonization of the lungs, liver, and spleen respectively. A $\Delta mntH\Delta sit$ strain was further attenuated, demonstrating reduced persistence in blood, and a mean 1400-fold, 954-fold, and 83-fold reduced colonization in lungs, liver, and spleen respectively. In co-infections, the $\Delta feoB\Delta sit$ strain demonstrated reduced persistence in blood, but increased colonization of the liver. The $\Delta mntH$, $\Delta feoB$, and $\Delta feoB\Delta mntH$ strains were as virulent as the wild-type in either of the infection models. Strains were also tested for sensitivity to oxidative stress generating agents. The $\Delta mntH\Delta sit$ strain was the most sensitive strain and was significantly more sensitive to hydrogen peroxide, plumbagin and paraquat. *sit* sequences were highly associated with APEC and human ExPEC compared to commensal isolates and diarrheagenic *E. coli*. Comparative genomic analyses also demonstrated that *sit* sequences are encoded on conjugative plasmids or associated with phage elements, and have likely been acquired by distinct genetic events among pathogenic *E. coli* and *Shigella* spp. Overall, results demonstrate that SitABCD contributes to virulence and, together with MntH, to increased resistance to oxidative stress.

INTRODUCTION

The *Salmonella* iron transporter, SitABCD, was first identified in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium as a homolog of the *Yersinia pestis* YfeABCD transporter [235], and is a member of the periplasmic binding-protein (PBP) dependent, ATP binding-cassette (ABC) family of metal transporters [63]. In *Y. pestis* and *S. enterica* serovar Typhimurium, inactivation of the genes encoding the Yfe and Sit transporters respectively decreased virulence in murine experimental infection models. [58, 59]. SitABCD homologs are also present in other pathogenic enterobacteria including *Shigella* spp. [54, 313, 314], uropathogenic *E. coli* (UPEC) [71, 337, 338], and avian pathogenic *E. coli* (APEC) [77, 339-341]. The genes encoding the Sit system are located on either genomic islands or on large plasmids, and some strains encode more than one copy of the *sit* system [77, 340-342].

Previously, SitABCD from APEC strain χ 7122 was shown to transport iron and manganese and, in the absence of the endogenous manganese transporter MntH, SitABCD contributed to protection of APEC and *E. coli* K-12 against hydrogen peroxide [77]. SitABCD from *S. enterica* serovar Typhimurium similarly mediated transport of manganese and iron, and in combination with MntH contributed to resistance to hydrogen peroxide [56]. Further, loss of Sit in combination with loss of either MntH or the Feo ferrous iron transporter resulted in greater attenuation of *Salmonella* virulence in susceptible mice [56]. In *Shigella flexneri* 2a, a *sit* mutant was less able to grow in iron-restricted medium [54, 343]. However, loss of Sit had no appreciable effect on intracellular multiplication or cell-to-cell spread in epithelial cells or virulence in the guinea pig kerato-conjunctivitis model [54, 343]. By contrast, the cumulative loss of Sit and iron transporters such as Feo or the aerobactin siderophore system resulted in a reduced capacity to form plaques on epithelial cells [54]. In addition, cumulative loss of Sit and MntH

resulted in a reduced capacity of *Shigella flexneri* 2a to survive in macrophage cell lines [62].

Divalent ion transporters such as SitABCD, MntH, and Feo may contribute to virulence of APEC and other bacterial pathogens by facilitating acquisition of iron and/or manganese. Both manganese and iron are essential co-factors for enzymes required for metabolic processes and protection against oxidative stress [16, 20, 307]. Thus far, the role of the SitABCD transporter alone and in combination with other divalent metal transporters, such as MntH and Feo, in the virulence of pathogenic *E. coli* has not been investigated. A *sitABCD* mutant derivative of APEC strain χ 7122 (O78:K80:H9) caused lesions in chickens similar to the parental strain and was also as resistant to hydrogen peroxide as the wild-type parent, suggesting that other metal transporters were possibly compensating for the absence of the Sit system [77]. However, a *sitB* signature-tagged transposon (STM) mutant of APEC strain IMT5155 (O2:K5), which contains two copies of the *sit* genes, was moderately attenuated compared to its wild-type parent in a co-infection competition model in chickens [344], suggesting a role for the Sit transporter in virulence. Herein, we investigated the individual role of SitABCD for the virulence of APEC O78:K80 strain χ 7122 in single-strain infection and competitive infection models in chickens. In addition, we determined the roles of the MntH or Feo transporters alone or combined with SitABCD for the virulence of APEC strain χ 7122 in the chicken and for resistance to oxidative stress agents. The distribution of *sit* genes among pathogenic *E. coli* and *E. coli* reference strains was also assessed. Finally, the *sit* sequences available from the genomic databases were compared and suggest that *sit* genes have likely been inherited through distinct transfer events leading to integration within conjugative plasmids in APEC, or prophage-associated genomic islands among *E. coli* and *Shigella* spp.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial strains, plasmids, media and growth conditions. Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. In addition, clinical and commensal fecal isolates from various sources were used to screen for the presence of *sit* sequences. The 72 members of the *Escherichia coli* reference (ECOR) collection represent a diversity of *E. coli* strains that have been phylogenetically grouped by multi-locus enzyme electrophoresis (MLEE) [345]. The 297 APEC clinical isolates were described elsewhere [78]. APEC strains were previously classified for virulence based on lethality for 1-day-old chicks following subcutaneous inoculation, where LC1 corresponds to the high-lethality class, LC2 to the low-lethality class, and LC3 to the non-lethal class [78]. Human ExPEC isolates included 32 strains from urosepsis and other extra-intestinal infections from the U. S. A. obtained from J. R. Johnson (Veterans Administration Medical Center, Minneapolis Minnesota). Thirty-two *E. coli* fecal isolates from healthy poultry and 23 diarrheagenic *E. coli* belonging to various pathotypes (12 ETEC, 6 EPEC and 5 EHEC) were kindly provided by J. M. Fairbrother (University of Montreal, Canada). Strains were grouped phylogenetically by either MLEE or a multiplex PCR method [346]. Strains were maintained at –80°C in 25% glycerol following overnight culture in Luria-Bertani (LB) broth (10 g yeast extract, 5 g tryptone, and 10 g NaCl per liter). Strains and clones were routinely grown in LB broth or on LB agar plates (15 g agar per liter) at 37°C. *E. coli* strain DH5α was routinely used for plasmid cloning and recovery. Antibiotics were added as required at the following concentrations: kanamycin (30 µg/ml); ampicillin (100-200 µg/ml); chloramphenicol (30 µg/ml); nalidixic acid (15 µg/ml); and tetracycline (10 µg/ml).

DNA and genetic manipulations. Standard methods were used for isolation of bacterial genomic DNA, DNA manipulation, and cloning [347]. Restriction enzymes and DNA ligase used in this

study were purchased from New England Biolabs (NEB), Invitrogen, or Amersham-Pharmacia and used according to the suppliers' recommendations. Recombinant plasmids, PCR products, and restriction fragments were purified using plasmid mini-prep, PCR clean-up, and gel extraction kits (Qiagen or Sigma) as recommended by the supplier. Transformation of *E. coli* strains was routinely done by using the calcium/manganese based (CCMB) or electroschock methods as described [348].

Presence of *sit* sequences among *E. coli* strains. The presence of *sit* sequences was investigated among different *E. coli* strains by PCR amplification of segments of the *sitA* and *sitD* genes that span the length of the *sitABCD* system. The *sitA* primers (*sitA*-F 5'-CGCAGGGGGCACAACACTGAT-3' and *sitA*-R 5' CCCTGTACCAGCGTACTGG-3') amplify a 663 bp segment of *sitA* and the *sitD* primers (*sitD*-F 5'-CTGTGCGCTGCTGTCGGTC-3' and *sitD*-R 5'-GCGTTGTGTCAGGAGTAC-3') amplify a 570 pb segment of *sitD*. The specificity of each of the primers and predicted amplification products were verified by comparative genomics/bioinformatics analysis against the *sit* genes from the *E. coli* and *Shigella* genomes or other nucleotide entries in the available databases including Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and *coli*BASE, an online database for comparative genomics of *E. coli* and related Enterobacteria (<http://colibase.bham.ac.uk/>) [349]. Crude DNA extracts of strains were prepared by alkaline lysis [350]. The reactions were carried out using Taq DNA polymerase (New England Biolabs). A 5 µl volume of each bacterial cell lysate was added to a PCR reaction mixture of a final volume of 25 µl containing 6.25 pmol of each primer, 5 nmol of each dNTP, and 0.5 U of Taq polymerase in 1X buffer. PCR conditions were as follows: 95°C for 1 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, 72°C for 1 min, and then an extension period of 72°C for 1 min. Specific amplification was confirmed using strain χ 7122 and

CFT073 as positive controls and *E. coli* K-12 MG1655, which lacks the *sit* genes, as a negative control.

Construction of mutant derivatives of APEC strain χ 7122 and single-copy complementation of the Δ *sit* mutation. The Δ *sitABCD::tetAR* (QT205), Δ *mntH::kan* (QT878), and Δ *mntH\Delta**sitABCD* (QT1239) derivatives of strain χ 7122 are described elsewhere [77]. QT1517 was generated by FLP-mediated excision of the Δ *mntH::kan* allele from strain QT878 by using plasmid pCP20 [315]. The Δ *feoB::kan* allele from *E. coli* K-12 strain JWK3372_1 [351] was used to introduce Δ *feoB* mutations into APEC strains. Briefly, the Δ *feoB::kan* allele was amplified from genomic DNA of strain JWK3372_1 using primers MfeoB1 5'-TCTGGTCTCATGTCGCTGTC-3' and MfeoB2 5'-GGTGGAACTCTGCTTTTTGC-3' and was introduced into strains χ 7122, QT205, and QT1517 by homologous recombination using the λ red recombinase method [315]. Successful transfer of the Δ *feoB::kan* mutation was confirmed by PCR using primers flanking the *feoB* region. The Δ *feoB::kan* derivatives of χ 7122, QT205, and QT1517 were designated QT877, QT1240, and QT1539 respectively.

The Δ *sitABCD* mutant strain QT205 was complemented by single-copy integration of plasmid pIJ93. pIJ93 was constructed by subcloning the XbaI-SalI fragment of pIJ28 containing the *sitABCD* operon into the same sites of suicide vector pGP704. pIJ93 was conjugated from strain MGN-617 (16) to strain QT205. A strain that was resistant to ampicillin and found to contain a full-length copy of the *sit* genes as confirmed by PCR was designated QT770.

Sensitivity of *E. coli* strains to reactive oxygen intermediate (ROI)-generating agents. Sensitivity to oxidative stress was determined by an agar overlay diffusion method on LB and M9-glucose plates (1.5% agar) as described by Boyer *et al.* [56] with some modifications. Overnight cultures grown in LB broth were adjusted to an OD₆₀₀ of 0.5. For tests on M9 medium,

the overnight cultures were washed with M9-glucose prior to OD₆₀₀ adjustment. 100 µl of each culture were suspended in molten top agar (0.5% agar) and poured over the agar plates. Filter paper disks (6 mm diameter; Beckton Dickinson) were added to the surface of the solidified overlays and 10 µl of hydrogen peroxide (30%), paraquat (200 mM for LB, 40 mM for M9), plumbagin (53 mM), phenazine methosulfate (PMS) (15 mM) or phenazine ethosulfate (PES) (15 mM) were spotted onto the disks. The plates were then incubated overnight at 37°C, and following growth the diameters of inhibition zones were measured.

Experimental infection of chickens via the airsacs. Two different infection models were used to investigate the importance of different metal transporters for the virulence of APEC, a comparative single-strain infection model and a competitive co-infection model. Chickens used in these studies were White Leghorn specific-pathogen-free chickens obtained from either Charles River Spafas (now Charles River Laboratories) (Franklin, Connecticut) or the Canadian Food Inspection Agency (Ottawa, Canada). For the single-strain infection model, groups of 3-week-old White Leghorn chickens were inoculated in the right thoracic airsac with 0.1 ml (10^7 CFU) of a bacterial inoculum consisting of a diluted 24-h beef heart infusion broth culture of APEC strain χ 7122 or isogenic mutant-derivatives. For the co-infection experiments, strains were prepared as for the single-strain infections and an equal quantity (5×10^6 CFU) of each mutant strain and a virulent $\Delta lacZYA$ derivative of strain χ 7122 (QT51) were used as the inoculum. Use of the $\Delta lacZYA$ derivative of strain χ 7122 (QT51) in co-infections permitted a direct evaluation of the number of colonies of QT51 (Lac- colonies) compared to the metal transporter mutant (Lac+ colonies) from each plate. For the co-infection studies, blood samples were collected aseptically from each chicken 6, 24, and 48 h following bacterial inoculation and were plated directly or diluted and plated on MacConkey-lactose agar plates (Difco) supplemented with nalidixic acid

(40 µg/ml). All birds were euthanized at 48 h postinfection and then necropsied. For the single-strain infection experiments, gross mean lesion scores for the air sacs and combined lesion scores for the pericardium and liver were determined as described by Lamarche *et al.* [352]. Organs were aseptically removed. The left lung, liver, and spleen of each animal were weighed, suspended in phosphate-buffered saline, and homogenized with an Omnimixer homogenizer. Dilutions of homogenates were plated onto MacConkey-lactose agar plates with appropriate antibiotics for bacterial quantification. Several randomly selected colonies per organ were verified by serotyping using O78-specific antiserum.

Bioinformatics analysis and comparison of *sit* sequences from different *E. coli* and *Shigella* strains. The sequences and locations of *sit* gene clusters within the genomes of various *E. coli* and *Shigella* strains were identified from the available databases including Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) and *coli*BASE. Sequence analyses, multiple sequence alignment by CLUSTALW, and generation of a phylogenetic tree were done using the MEGA3: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software package (<http://www.megasoftware.net>) [353]. The phylogenetic tree of the *sitABCD* gene clusters was constructed by using the neighbour-joining method [354] of pairwise comparison by maximum likelihood analysis using the Jukes-Cantor estimate [355] to calculate nucleotide substitution rates.

Statistical analyses. Statistical analyses were performed using the Prism 4.0b software package (GraphPad Software).

RESULTS

The *sit* genes are associated with prophage elements and conjugative plasmids. A previous report indicated that depending on the *E. coli* strains, *sitABCD* genes were either located on

pColV-type plasmids or on the bacterial chromosome in ExPEC or APEC, and certain strains contained both a genomic and a plasmid-encoded copy of the *sit* genes [77]. Analysis of the genome and nucleotide sequence databases indicated that *sit* sequences are present in ExPEC-UPEC strains CFT073, 536, and UT189, APEC strain O1, enteroaggregative *E. coli* O42 (Fig. 1), and all of the currently available *Shigella* genomes, but are absent from *E. coli* K-12 strains and the genomes of other pathogenic *E. coli*. *sit* gene clusters are also present on the plasmids of APEC O1 (pAPEC-O1-ColBM), APEC O2 (pAPEC-O2-ColV), and APEC χ 7122 (pAPEC-1) (Fig. 1), and a genomic and plasmid encoded copy of *sit* sequences are present in APEC O2:K5 strain IMT5155 (Genbank accession nos. AM072350 and AM072351).

The *sit* gene clusters are present at 4 distinct chromosomal locations in the *E. coli-Shigella* genomes (Fig. 1A). Among the sequenced ExPEC-UPEC strains and APEC O1, the *sitABCD* genes are all part of genomic regions containing prophage sequences that are inserted at the the *icd-ycgX* intergenic region, which is the *attB* attachment site for certain lambdoid bacteriophages. These prophage element containing regions have identical junction borders compared to the *E. coli* K-12 genome and vary in size from 55 kb (CFT073) [71] to 47.3 kb (APEC O1) [341]. In *E. coli* K-12 MG1655 this region harbors the ϵ 14 element, a vestige of a lambdoid prophage, which encompasses 15.4 kb [356]. In EAEC strain O42, *Shigella sonnei* and *Shigella dysenteriae*, the *sit* genes are part of 48.4 kb, 25.6 kb, and 19.9 kb regions respectively comprised mainly of phage elements, and are inserted at the *ydaO* (b1344)-*ynaF*(b1376) region of *E. coli* K-12 MG1655 [349]. This region is the attachment site for Rac prophage and related prophage elements in *E. coli* K-12 and O157:H7 strains [357]. In *S. flexneri* 2a strain 301, *sit* genes are in the middle of a 42 kb genomic island SI-19 located in a region that has undergone rearrangements compared to *E. coli* MG1655. SI-19 contains genes that are homologous to phage sequences and *IS* elements,

and is flanked by sequences corresponding to *ycjI* and *yebU* in *E. coli* K-12 MG1655[314]. In *S. flexneri* 2a strain 2457T, *sit* genes are in the middle of a 37 kb genomic island that is adjacent to *aspS*. Despite differences in the locations of the *sit* genes within the genomes of *S. flexneri* 2a strains 301 and 2457T, the lambdoid prophage sequences immediately flanking the *sit* genes in these two genomes are similar. Sequences flanking the *sit* genes on plasmids are similar to each other, but are distinct from those adjacent to the *sit* genes present on the genomic islands of any of the *E. coli* or *Shigella* strains.

Comparison of the nucleotide sequences encoding SitABCD from *E. coli* and *Shigella* strains in a neighbour-joining tree demonstrated that *sit* gene clusters form 3 main groups comprised of the ExPEC-APEC genomic *sit* sequences, the *Shigella sit* sequences and the plasmid-encoded APEC *sit* sequences (Fig. 1B). The *E. coli* O42 *sit* sequence branched separately, but was most closely related to *Shigella* sequences. Phylogenetic analyses of each of the *sit* genes also generated the same distinct groupings (data not shown). Overall, the *sit* sequences demonstrated nucleotide variability at 156 sites, which corresponded to a variability at 4.5% of the *sit* gene cluster. Sequences within each of the 3 main cluster groups demonstrated low variability (from 0.4% to 0.6% overall) within their respective clusters. By contrast, between cluster groups, variability increased by 2- to 6-fold (from 1.2% to 2.5%). Taken together, these differences in genomic locations and nucleotide sequence variability among the *sit* genes from different *E. coli* and *Shigella* strains support the likelihood that *sit* genes have been acquired by these two closely related species via a number of distinct genetic events, involving horizontal gene transfer mediated by phages, plasmids or other mobile genetic elements.

Distribution of *sit* genes among the ECOR collection, and *E. coli* clinical and fecal commensal isolates. The presence and distinct localisation of *sit* sequences among different *E. coli* and *Shigella spp.* prompted us to further investigate the distribution of *sit* sequences among a

diversity of strains including, the ECOR collection, ExPEC, diarrheagenic *E. coli*, APEC and avian fecal commensal *E. coli* strains. PCR analysis was performed using *sitA*- and *sitD*-specific primers which correspond to conserved regions in the *sitA* and *sitD* genes currently available from the sequence databases. For all strains tested, there was no discrepancy between results when using either the *sitA* or *sitD* primers. Among the 72 members of the ECOR collection, which have been arranged into four phylogenetic groups (A, B1, B2, D) on the basis of multi-locus enzyme electrophoresis [345], the presence of *sit* sequences was significantly associated with phylogenetic group B2 when compared to the other groups ($P < 0.001$), (Table 2). All B2 group strains from the ECOR collection were *sit*-positive, whereas in the other phylogenetic groups 50% or less were *sit*-positive. In addition, all 32 human ExPEC strains tested were *sit*-positive, whereas only 2 of 23 diarrheagenic *E. coli* contained *sit* sequences (Table 2). The presence of *sit* sequences was also investigated in APEC and avian fecal commensal isolates (Table 3). In 297 APEC strains classified according to their lethality for day-old chicks, *sit* sequences were more common in the highly virulent APEC (class 1 lethality) strains (99%) than in the less virulent strains (81% in class 2, 68% in class 3) ($P < 0.001$). In addition, *sit* sequences were highly associated with APEC compared to avian fecal commensal isolates ($P < 0.001$). In APEC, 275/297 (93%) were *sit*-positive whereas only 14/32 (44%) of avian fecal isolates were *sit*-positive. Overall, results demonstrate that *sit*-sequences are highly prevalent in *E. coli* strains associated with extra-intestinal infections compared to diarrheagenic *E. coli* and commensal fecal isolates.

SitABCD contributes to virulence of APEC during infection of chickens. As *sit* sequences were highly associated with *E. coli* from extra-intestinal infections in poultry, we investigated the importance of *sit* genes for the virulence of APEC O78 strain χ 7122 in chickens. We first

compared the virulence potential of the $\Delta sitABCD$ mutant strain QT205 with its isogenic wild-type parent strain $\chi 7122$ in a single-strain infection model. Compared to wild-type parent strain $\chi 7122$, strain QT205 ($\Delta sitABCD$) was attenuated and demonstrated significantly reduced bacterial numbers in the lungs and livers of infected chickens (Fig. 2a and 2b). QT205 demonstrated a mean 1-log reduction in colonization of the spleens, however, this decrease was not significant ($P=0.0545$) (Fig. 2c). The *sit*-complemented derivative of QT205 (QT770) regained virulence to levels comparable to the wild-type parent $\chi 7122$ (Fig. 2). Despite the decreased persistence of QT205 in chickens, this strain caused gross lesions of airsacculitis and pericarditis/perihepatitis that were similar to those caused by the wild-type parent (data not shown).

We also investigated the role of the Feo ferrous iron transporter and MntH manganese transporter for the virulence of APEC strain $\chi 7122$. In single-strain infection experiments, in contrast to strain QT205 ($\Delta sitABCD$), strains QT877 ($\Delta feoB$) and QT878 ($\Delta mntH$) persisted in all tissues at levels similar to wild-type APEC strain $\chi 7122$. Thus, in the presence of a functional SitABCD system, FeoB or MntH did not appear to be of major importance for the virulence of APEC $\chi 7122$ in chickens. In addition, in the single-strain infection model, mutant strains QT1239 ($\Delta sitABCD \Delta mntH$) and QT1240 ($\Delta sitABCD \Delta feoB$) were not any more attenuated than the $\Delta sitABCD$ single mutant QT205. The mutant derivatives lacking functional Sit, MntH, and/or Feo transporters demonstrated no appreciable difference in growth rate when compared to the wild-type parent when cultured in either rich (Luria broth) or minimal (M9-glucose) medium (data not shown). Therefore, the reduced colonization of tissues by the *sit* and other attenuated mutants during infection of chickens is most likely due to a decreased capacity to survive *in vivo*,

and not a global reduction in fitness or growth.

When compared to single-strain infection models, competitive co-infection models between virulent strains and isogenic mutants can demonstrate more sensitivity to differences in colonization or virulence. As single-strain infections in chickens did not show any attenuation for strains QT877 ($\Delta feoB$) and QT878 ($\Delta mntH$), and since no differences in attenuation between strain QT205 ($\Delta sitABCD$) and the double mutants QT1239 ($\Delta sitABCD \Delta mntH$) or QT1240 ($\Delta sitABCD \Delta feoB$) were observed in single-strain infections, we tested these strains in a competitive co-infection model. For this model, we used APEC strain QT51, a $\Delta lacZYA$ derivative of strain $\chi 7122$, as the competitor strain. QT51 was shown to be as virulent as the wild-type parent strain $\chi 7122$ in both single-strain infection and co-infection experiments (data not shown). The use of a virulent Lac-negative wild-type derivative permitted us to directly compare the levels of the Lac-positive mutant derivative and the virulent Lac-negative competitor strain from the same biological samples by differential counts on MacConkey-lactose agar plates.

In co-infection experiments, strain QT205 ($\Delta sitABCD$) was clearly attenuated, and showed a significantly reduced competitive index (CI) compared to competitor strain QT51, with a mean 50-fold decrease in the lung (Fig. 3a) and a mean 126-fold decrease in the liver (Fig. 3b). These results were consistent with the results observed for the single-strain infection experiments. In addition QT205 was also significantly reduced by a mean of 25-fold in the spleen (Fig. 3c). During the course of the infection, no significant differences between QT51 and QT205 were apparent in the blood at 6 h and 24 h post-infection (Fig. 4). However, QT205 was significantly reduced by a mean of 3.6 fold in the blood by 48h post-infection. Unlike strain QT205, strains QT877 ($\Delta feoB$) and QT878 ($\Delta mntH$) were present at similar levels to strain QT51

in all tissues and blood (Figs. 3 and 4). These results were consistent with the lack of attenuation of these strains in the single-strain infection model.

In co-infections using the double mutants, strain QT1239 ($\Delta sitABCD \Delta mntH$) was the most attenuated strain (Figs. 3 and 4). QT1239 demonstrated a significantly reduced CI in the blood at all times with mean decreases of 2.2-fold, 16.2-fold and 10-fold compared to the competitor strain at 6 h, 24 h and 48 h respectively. QT1239 also demonstrated a mean 1400-fold reduction in the lungs, 954-fold reduction in the liver, and 83-fold reduction in the spleen compared to strain QT51. By contrast strain QT1240 ($\Delta sitABCD \Delta feoB$) demonstrated a significant mean 2.2-fold and 5.6-fold reduction in the blood at 24 h and 48 h respectively. QT1240 was also reduced 26.8-fold in the lungs and 6.8-fold in the spleen, but was not significantly reduced in the liver (Fig 3). Strain QT1539 ($\Delta feoB \Delta mntH$) did not demonstrate any significant decrease compared to strain QT51 in either the blood or tissues (data not shown). Comparison of the mean CIs using either strains QT205 ($\Delta sitABCD$), QT1239 ($\Delta sitABCD \Delta mntH$) or QT1240 ($\Delta sitABCD \Delta feoB$) demonstrated no significant differences between the groups in the blood and spleen. In the lung, QT1239 ($\Delta sitABCD \Delta mntH$) was significantly more attenuated in the co-infection model compared to QT205 ($\Delta sitABCD$) ($P=0.0178$). By contrast, QT205 ($\Delta sitABCD$) was significantly more attenuated than QT1240 ($\Delta sitABCD \Delta feoB$) ($P=0.0061$) in the liver. Taken together, these results demonstrate that individually the Sit system is most important for competitive survival and persistence compared to the Feo and MntH transporters. In addition, cumulative loss of Sit and MntH transporters globally resulted in more marked attenuation compared to loss of only the Sit transporter. By contrast, cumulative loss of Sit and Feo systems compared to the individual loss of Sit actually resulted in reduced persistence in the blood, but increased colonization of the liver.

Sensitivity of *E. coli* strains to reactive oxygen intermediate (ROI)-generating compounds.

The sensitivity of APEC strain χ 7122 and mutant derivatives to ROI-generating compounds was assessed on both rich (LB) and minimal (M9-glucose) media (Fig. 5). On LB medium, only the $\Delta mntH\Delta sitABCD$ (QT1239) was more sensitive than its wild-type parent strain to the ROI-generating compounds H_2O_2 (P=0.002) and plumbagin (P=0.027). On minimal medium, QT1239 was more sensitive to H_2O_2 (P=0.015), plumbagin (P=0.004), and paraquat (P=0.004). On minimal medium, the $\Delta mntH$ mutant QT878, was more sensitive to H_2O_2 (P=0.012) and paraquat (P<0.001) than the APEC wild-type parent, but was less sensitive to these products than the $\Delta mntH\Delta sitABCD$ derivative. In addition, on minimal medium the $\Delta feoB\Delta sitABCD$ strain (QT1539) was also somewhat more sensitive to H_2O_2 (P=0.007) than the wild-type parent. By contrast, the $\Delta sitABCD$ mutant QT205 did not demonstrate any increased sensitivity to ROI-generating products when compared to the wild-type parent (data not shown).

APEC strain χ 7122 was intrinsically more resistant to all of the ROI-generating compounds tested than the K-12 control strain following growth on either LB or minimal medium (P<0.05) (Fig. 5). In addition, the APEC metal transporter mutants that were more sensitive to certain ROI-generating compounds were always resistant to PMS and PES. Compared to the other ROI-generating compounds, PMS and PES specifically generated a superoxide stress response, as the $\Delta soxS$ K-12 strain, but not the $\Delta oxyR$ derivative, demonstrated sensitivity to these compounds (Fig. 5). Taken together, these results demonstrate that the MntH and SitABCD divalent-metal transporters synergistically contributed to increased resistance of ROIs that generate either a H_2O_2 -specific or a mixed H_2O_2 and superoxide stress response. In contrast to the *in vivo* studies in chickens, in which the Sit transporter was the only system studied that individually contributed to virulence, *in vitro* only the MntH transporter was shown

to individually contribute to resistance to oxidative stress.

Discussion:

In this report we have investigated the individual and combined roles of the SitABCD, MntH, and FeoB transporters for the virulence of APEC strain χ 7122. These transport systems are mainly involved in the import of manganese and/or ferrous iron. MntH is a proton dependent NRAMP-related transporter that is highly selective for manganese [20, 206], FeoB is a GTPase that functions in ferrous iron transport [230, 232], and SitABCD (YfeABCD in *Yersinia spp.*) is an ATP-binding cassette (ABC) transporter that mediates uptake of manganese and iron [20, 59, 77].

Iron plays a number of vital functions in bacterial cells and is a co-factor of numerous enzymes [16]. Importantly, iron plays a role in protection against oxidative stress, as it is a component of the SodB superoxide dismutase and catalase enzymes which eliminate superoxide (O_2^-) and H_2O_2 respectively. However, excess iron can also contribute to oxidative damage through the generation of free radicals [16]. Due to the limited availability of iron in the host, pathogenic bacteria have acquired numerous iron-transport systems, some of which are major virulence factors [256]. Bacteria obtain ferric iron from the host either via siderophore systems, small molecular weight chelators that solubilize iron, or host iron transport protein receptors, whereas ferrous iron is transported by FeoB and SitABCD-like systems [256]. Manganese is also a cofactor for a number of bacterial enzymes, contributes to protection against oxidative stress [20], and can also contribute directly to the detoxification of ROIs [307]. In *E. coli* and other enterobacteria, two main systems have been identified in manganese transport, MntH and SitABCD [20, 77, 206]. Since iron and manganese are critical for bacterial tolerance to oxidative

stress as well as other metabolic functions, SitABCD, MntH and FeoB could potentially promote bacterial survival during infection by facilitating the transport of these trace metals and by countering oxidative stress during infection of the host.

FeoB and MntH orthologs are widespread among a diversity of bacteria [232, 358], and these systems are conserved among *E. coli*, as they are present in all the currently sequenced *E. coli* and *Shigella* genomes. Unlike *feoB* and *mntH*, *sit* genes are present in only a subset of *E. coli* strains. *sit* genes were predominant among extraintestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) and APEC, and *E. coli* belonging to phylogenetic group B2, but were absent from *E. coli* K-12 and most diarrheagenic *E. coli*, except for EAEC strain O42 (Fig. 1A; Tables 2 & 3). Among avian *E. coli*, we determined that *sit* genes were highly associated with the virulence of APEC for 1-day-old chicks (Table 3). This is the first report describing an association of *sit* genes with the virulence of APEC. In addition, *sit* genes were significantly associated with APEC (93%) compared to avian fecal commensal isolates (44%) (Table 3). Similarly, Rodriguez-Seik et al. [359] detected *sit* in 86.4 % of APEC strains compared to 42.7% among fecal commensal isolates from poultry. Overall, *sit* sequences are clearly prevalent among ExPEC and APEC compared to intestinal commensal *E. coli* strains.

In some *E. coli* strains, two or more copies of *sit* genes are present, with one copy being encoded on a plasmid and another copy being chromosomally encoded [341, 342, 360, 361]. Recently, Ewers et al. [360] also detected the specific presence of episomal and chromosomal copies of *sit* by PCR using specific primers. They detected 31.6% prevalence of *sit* among APEC using the chromosome-specific primers and 73.2% prevalence of *sit* among APEC using episome-specific primers. These results suggest APEC strains more commonly contain a plasmid-encoded copy of *sit* than chromosomally-encoded *sit* genes. Chromosomal copies of *sit* genes are associated with different phage elements (Fig. 1A). Hence, in certain strains *sitABCD* represents

another virulence factor that may have been acquired via bacteriophages, which are common contributors to bacterial diversification and adaptability [68, 357]. It is tempting to speculate that recombination or integration events within a single-strain may have led to the duplication of *sit* genes. However, comparative sequence analysis demonstrates higher identity among *sit* sequences located in genomic islands from different strains than between genomic island- and plasmid-encoded *sit* sequences from the same strain (Fig. 1B). These findings favor the likelihood that *sit* genes may have been independently acquired from different sources by distinct events resulting in the incorporation of these genes into either plasmids or prophage-associated genomic islands in the genomes of *Shigella* and ExPEC.

The increased association of *sit* genes with ExPEC and APEC compared to other *E. coli* strains suggested a possible role for this transporter in virulence during extra-intestinal infection. In UPEC strain CFT073, *sit* genes were upregulated in the urine of mice during urinary tract infection or *in vitro* following growth in human urine [362]. As well, in *Shigella flexneri* 2a, expression of *sit* genes was upregulated during infection of cells [329, 363]. This further suggests that SitABCD may contribute to metal transport *in vivo* and virulence during extra-intestinal infections. In both the single-strain infection and competitive infection models, the APEC $\Delta sitABCD$ mutant was clearly attenuated and less able to colonize the tissues and persist in blood of infected chickens (Figs. 2 to 4). By contrast, the single-strain infection and the co-infection results demonstrated that in the presence of a functional SitABCD transporter, the inactivation of FeoB or MntH did not reduce the virulence of APEC strain $\chi 7122$. In addition, the combined loss of *feoB* and *mntH* did not reduce virulence. Hence, in contrast to the MntH and FeoB transporters, the Sit transporter contributed significantly to the survival of APEC in extra-intestinal tissues. These results indicate that the divalent-ion transporter SitABCD imparts a

selective advantage compared to the MntH or FeoB transporters *in vivo*. The infection model used for these studies was the air-sac inoculation model (15, 16), which has been shown to result in a more uniform rate of infection of extra-intestinal tissues and blood when compared to the more natural aerosol route of infection (18, 64). However, by using the air-sac route in the single-strain infection model, despite the significantly decreased survival of the $\Delta sitABCD$ mutant in chickens, this strain caused gross lesions of airsacculitis and pericarditis/perihepatitis that were similar to those caused by the wild-type parent. This is likely because the attenuated strains remained in the tissues at levels of 3-log or above at 48 h post-infection in most birds. Such bacterial levels are likely to be sufficient to still elicit a strong inflammatory response and the generation of gross lesions. It is possible that the use of the aerosol route in single-strain infection experiments, could potentially demonstrate differences in pathology of colibacillosis between strains that were not observed via the air sac route, as the aerosol route requires APEC to initially colonize and proliferate in the upper respiratory tract and then subsequently invade deeper tissues.

The use of the competitive infection model provided increased sensitivity compared to the single-strain infections. This was most evident in analyses of mutants that have lost both SitABCD and MntH divalent manganese-transport functions or SitABCD and FeoB divalent iron-transport functions (Fig. 3 and 4). No significant difference in any site was observed in the single-strain infections when comparing these double mutants to the mutants who lacked the Sit transporter alone. This is likely due to the combination of competitive pressure between strains in addition to pressures due to immune defences and nutritional limitations within the host using the competitive infection model [261, 364].

The contribution of Sit for the virulence of APEC may in large part be due to its

function as an efficient manganese transporter [77], and the importance of manganese for coping with oxidative stress. Cellular accumulation of manganese contributes to protection against oxidative stress by direct catalytic scavenging of ROIs and can also lead to increased activity of bacterial manganese-dependent superoxide dismutase (MnSOD) [307]. In *E. coli*, MnSOD, encoded by *sodA*, is an inducible SOD that responds to increases in oxidative stress, and MnSOD more effectively protected *E. coli* against paraquat and H₂O₂ than FeSOD, encoded by *sodB* [365]. An efficient capacity to accumulate Mn by APEC via the Sit and MntH transporters is therefore likely to contribute to survival in host extra-intestinal sites. The infection results demonstrated that loss of MntH alone had no discernable effect on virulence in the chicken, whereas loss of Sit alone did reduce virulence. Conversely, MntH alone contributed to protection of APEC against ROIs, whereas Sit alone had no significant contribution to resistance to oxidative stress *in vitro* (Fig. 5). This may be explained by differences in environmental conditions which may affect the activity of each of these transport systems. MntH transports metals via a proton-dependent gradient, and as such functions best under acidic conditions [236]. By contrast, Sit-mediated transport is most efficient under alkaline conditions [77, 236]. The pH in chicken blood and tissues is maintained at approx. 7.4, a pH at which Sit efficiently mediates Mn transport [56, 77]. It is also possible that the ATPase-mediated Sit ABC transporter may be more effective at tolerating stresses within the host that could impede the proton gradient required for proper functioning of MntH-mediated transport. Although Sit alone appeared to be more important than MntH *in vivo*, it is clear that the combined loss of the Sit and MntH transporters resulted in the greatest attenuation, particularly in the lung, and greater sensitivity to a number of ROI-generating compounds. Taken together, these results support a synergistic role for Sit and MntH to transport manganese and contribute to a greater overall resistance to oxidative stress and persistence during infection.

Loss of Sit and MntH rendered the APEC strain more susceptible to a number of ROI-generating compounds, particularly on minimal medium (Fig. 5). Manganese transporters in a number of bacteria have been shown to contribute to resistance to H₂O₂ and superoxide [307]. As observed for *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Shigella flexneri* 2a *mntH sit* mutants [56, 62], the APEC $\Delta mntH\Delta sitABCD$ mutant was more sensitive to H₂O₂ (Fig. 5); [77]. In addition, the APEC $\Delta mntH\Delta sitABCD$ mutant was also more sensitive to certain redox cycling agents including plumbagin and paraquat. These compounds generate superoxide radicals, however superoxide can be readily converted into H₂O₂ by SODs within bacterial cells. The use of $\Delta oxyR$ and $\Delta soxS$ K-12 control strains which were both more sensitive to plumbagin and paraquat also suggested that subsequent generation of H₂O₂ occurred following exposure to these compounds. By contrast, neither APEC $\Delta mntH\Delta sitABCD$ or the $\Delta oxyR$ control were more sensitive to phenazines (PMS and PES) than their parent strains, although these compounds more effectively killed the $\Delta soxS$ control. Differences observed in sensitivity to redox cycling agents may therefore be due to their mechanisms of action for generation of oxidative stress or possibly other toxic effects. In *E. coli*, the response to oxidative stress generated by PMS differs considerably to that generated by paraquat or plumbagin, with PMS generating a high level of catalase activity and little increase in SOD activity, whereas paraquat and plumbagin induce increases in both SOD and catalase activities [366, 367].

Although, the Sit transporter from APEC strain $\chi 7122$ was shown to mediate uptake of iron in an iron transport-deficient *E. coli* K-12 mutant [77], it is unlikely that iron transport by SitABCD is a key feature for APEC virulence. Strain $\chi 7122$ uses three confirmed siderophore systems (aerobactin, salmochelins and enterobactin) in addition to the Feo and SitABCD transporters. Elimination of the aerobactin and salmochelin siderophore systems resulted in a

nearly complete loss of persistence of APEC strain χ 7122 in chickens [225], suggesting that the remaining iron transport systems (FeoB, SitABCD, and enterobactin) were unable to meet the iron transport requirements for survival of APEC during an extra-intestinal infection. This is not surprising since FeoB and SitABCD function mainly as ferrous iron transporters [77, 232], and iron present in extra-intestinal tissues is predominantly ferric iron associated with host ferroproteins. Further, although enterobactin is a highly efficient siderophore *in vitro*, it competes poorly as a siderophore in host tissues [16, 256]. The finding that the cumulative loss of the Sit and Feo ferrous iron transporter did not result in greater attenuation than the Δ *sitABCD* mutant are in further support of a limited requirement of these systems for iron-acquisition in extra-intestinal tissues (Fig. 3). However, the combined loss of Sit and Feo resulted in a decreased capacity to persist in the blood (Fig. 4). It is possible that in the blood, where iron availability is minimal, the ferrous transport functions of Feo and Sit in combination with efficient ferric siderophore systems could provide a modest competitive edge. Further, the combined loss of Feo and Sit also increased sensitivity to hydrogen peroxide (Fig. 5), suggesting the cumulative importance of these two transporters under certain conditions. By contrast, combined loss of Sit and Feo actually resulted in a significant regain in colonization of the liver compared to the Δ *sitABCD* mutant in the competitive co-infection model (Fig. 3c). The liver functions in iron storage and recycling. During infection, increased cell death, and tissue necrosis in the liver may lead to localized tissue anoxia and increased availability of ferrous iron at lesion sites. Under anaerobic conditions and increased availability of ferrous iron, the Feo transporter may therefore be deleterious. In support of this, compared to its wild-type parent, an *E. coli* K-12 *feo* mutant grown anaerobically was more resistant to H₂O₂-mediated killing than its isogenic parent strain [93].

In APEC, the *sit* genes are commonly located on large conjugative (ColV or ColBM) plasmids [77, 340, 342, 360, 361]. The role of such plasmids in various APEC or pathogenic *E. coli* have been established in a number of reports [78, 368-372], although specific plasmid-encoded genes contributing to APEC virulence are less well characterized. The Sit transporter, along with the aerobactin and salmochelin siderophores [225], and Tsh [78] represents another plasmid-encoded virulence factor of APEC strain χ 7122. When compared with the divalent manganese or iron transporters MntH or FeoB, the importance of SitABCD iron- and manganese-transport for virulence of APEC is preponderant. Hence, in addition to providing an advantage for intracellular survival for *Salmonella enterica* and *Shigella flexneri* 2a, in APEC Sit appears to provide an adaptive advantage during extra-intestinal survival. The reduction in virulence together with the increased sensitivity to ROI-generating compounds observed for some of the APEC metal transport mutants suggests that reduced survival during infection could possibly be due to increased killing by phagocytes or the products they may liberate into the extracellular environment. Although, APEC strain χ 7122 is refractory to internalisation by avian phagocytes, APEC belonging to other serogroups such as O2 or O1 are more readily internalised and can survive within phagocytes [87]. In future studies, it will be of interest to determine if Sit contributes to increased survival of certain APEC within host cells and its potential role for virulence of ExPEC in human extra-intestinal infections.

Acknowledgements

We acknowledge Geneviève Garriss for construction of strain QT770. Funding for research was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council (NSERC), Canada and the Canadian Foundation for Innovation (CFI), and a Canada Research Chair (CRC) to CMD, and USDA grant 00-35204-9224 to RC and CMD. MS, MC, and ML were the recipients of Fondation Armand-Frappier Scholarships. JP was funded by a scholarship from 'Fonds de la recherche en santé Québec' (FRSQ).

REFERENCES

1. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-37.
2. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0008.
3. **Bearden, S. W., and R. D. Perry.** 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol* **32**:403-14.
4. **Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**:6032-42.
5. **Braun, V.** 2005. Bacterial iron transport related to virulence. *Contrib Microbiol* **12**:210-33.
6. **Brzuszkiewicz, E., H. Bruggemann, H. Liesegang, M. Emmerth, T. Olschlager, G. Nagy, K. Albermann, C. Wagner, C. Buchrieser, L. Emody, G. Gottschalk, J. Hacker, and U. Dobrindt.** 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12879-84.
7. **Carlioz, A., and D. Touati.** 1986. Isolation of superoxide dismutase mutants in *Escherichia coli*: is superoxide dismutase necessary for aerobic life? *Embo J* **5**:623-30.
8. **Casjens, S.** 2003. Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far? *Mol Microbiol* **49**:277-300.
9. **Chang, A. C., and S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**:1141-56.
10. **Chaudhuri, R. R., A. M. Khan, and M. J. Pallen.** 2004. coliBASE: an online database for *Escherichia coli*, Shigella and Salmonella comparative genomics. *Nucleic Acids Res* **32**:D296-9.
11. **Chen, S. L., C. S. Hung, J. Xu, C. S. Reigstad, V. Magrini, A. Sabo, D. Blasiar, T. Bieri, R. R. Meyer, P. Ozersky, J. R. Armstrong, R. S. Fulton, J. P. Latreille, J. Spieth, T. M. Hooton, E. R. Mardis, S. J. Hultgren, and J. I. Gordon.** 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5977-82.
12. **Claverys, J. P.** 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res Microbiol* **152**:231-43.
13. **Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen.** 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**:4555-8.
14. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-5.
15. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, III.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:247-52.

16. **Dozois, C. M., M. Dho-Moulin, A. Brée, J. M. Fairbrother, C. Desautels, and R. Curtiss, III.** 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**:4145-54.
17. **Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E. M. Antao, C. Laturus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Bohnke, H. Steinruck, H. C. Philipp, and L. H. Wieler.** 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* **297**:163-76.
18. **Binns, C. A., M. L. Benham, L. M. Adams, K. G. Whithear, K. A. Bettelheim, B. S. Crabb, and G. F. Browning.** 2000. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infect Immun* **68**:1535-41.
19. **Hanahan, D., J. Jessee, and F. R. Bloom.** 1995. Techniques for transformation of *E. coli*, p. 1-35. *In* D. M. Glover and B. D. Hames (ed.), *DNA cloning I: Core techniques*, 2nd ed. Oxford Univ. Press, New York, NY.
20. **Hantke, K.** 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* **11**:192-5.
21. **Hassan, H. M., and I. Fridovich.** 1979. Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds. *Arch Biochem Biophys* **196**:385-95.
22. **Herzer, P. J., S. Inouye, M. Inouye, and T. S. Whittam.** 1990. Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**:6175-81.
23. **Horsburgh, M. J., S. J. Wharton, M. Karavolos, and S. J. Foster.** 2002. Manganese: elemental defence for a life with oxygen. *Trends Microbiol* **10**:496-501.
24. **Ike, K., K. Kawahara, H. Danbara, and K. Kume.** 1992. Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid. *J Vet Med Sci* **54**:1091-8.
25. **Janakiraman, A., and J. M. Slauch.** 2000. The putative iron transport system SitABCD encoded on SPI1 is required for full virulence of *Salmonella typhimurium*. *Mol Microbiol* **35**:1146-55.
26. **Jin, Q., Z. Yuan, J. Xu, Y. Wang, Y. Shen, W. Lu, J. Wang, H. Liu, J. Yang, F. Yang, X. Zhang, J. Zhang, G. Yang, H. Wu, D. Qu, J. Dong, L. Sun, Y. Xue, A. Zhao, Y. Gao, J. Zhu, B. Kan, K. Ding, S. Chen, H. Cheng, Z. Yao, B. He, R. Chen, D. Ma, B. Qiang, Y. Wen, Y. Hou, and J. Yu.** 2002. Genome sequence of *Shigella flexneri* 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of *Escherichia coli* K12 and O157. *Nucleic Acids Res* **30**:4432-41.
27. **Johnson, T. J., S. J. Johnson, and L. K. Nolan.** 2006. Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic *Escherichia coli* suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids. *J Bacteriol* **188**:5975-83.
28. **Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, J. A. Skyberg, A. M. Lynne, J. R. Johnson, and L. K. Nolan.** 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**:3228-36.

29. **Johnson, T. J., K. E. Siek, S. J. Johnson, and L. K. Nolan.** 2006. DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *J Bacteriol* **188**:745-58.
30. **Jukes, T. H., and C. R. Cantor.** 1969. Evolution of protein molecules., p. 21-132. *In* H. N. Munro (ed.), *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York.
31. **Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke.** 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **175**:6212-9.
32. **Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Schlauch, and M. E. Maguire.** 2002. SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**:3159-66.
33. **Kehres, D. G., and M. E. Maguire.** 2003. Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**:263-90.
34. **Keyer, K., A. S. Gort, and J. A. Imlay.** 1995. Superoxide and the production of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* **177**:6782-90.
35. **Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**:150-63.
36. **Lamarche, M. G., C. M. Dozois, F. Daigle, M. Caza, R. Curtiss, III, J. D. Dubreuil, and J. Harel.** 2005. Inactivation of the *pst* system reduces the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain. *Infect Immun* **73**:4138-45.
37. **Li, G., C. Laturus, C. Ewers, and L. H. Wieler.** 2005. Identification of genes required for avian *Escherichia coli* septicemia by signature-tagged mutagenesis. *Infect Immun* **73**:2818-27.
38. **Liu, M., H. Liu, L. Sun, J. Dong, Y. Xue, S. Chen, and Q. Jin.** 2005. Construction, detection and microarray analysis on the *Shigella flexneri* 2a *sitC* mutant. *Sci China C Life Sci* **48**:228-40.
39. **Lucchini, S., H. Liu, Q. Jin, J. C. Hinton, and J. Yu.** 2005. Transcriptional adaptation of *Shigella flexneri* during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen. *Infect Immun* **73**:88-102.
40. **Lymberopoulos, M. H., S. Houle, F. Daigle, S. Léveillé, A. Brée, M. Moulin-Schouleur, J. R. Johnson, and C. M. Dozois.** 2006. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol* **188**:6449-59.
41. **Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nrap orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* **35**:1065-78.
42. **McClelland, M., K. E. Sanderson, J. Spieth, S. W. Clifton, P. Latreille, L. Courtney, S. Porwollik, J. Ali, M. Dante, F. Du, S. Hou, D. Layman, S. Leonard, C. Nguyen, K. Scott, A. Holmes, N. Grewal, E. Mulvaney, E. Ryan, H. Sun, L. Florea, W. Miller, T. Stoneking, M. Nhan, R. Waterston, and R. K. Wilson.** 2001. Complete genome sequence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2. *Nature* **413**:852-6.
43. **Mehta, P., S. Casjens, and S. Krishnaswamy.** 2004. Analysis of the lambdoid prophage element e14 in the *E. coli* K-12 genome. *BMC Microbiol* **4**:4.
44. **Mellata, M., M. Dho-Moulin, C. M. Dozois, R. Curtiss, III, B. Lehoux, and J. M. Fairbrother.** 2003. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**:494-503.

45. **Miller, V. L., R. K. Taylor, and J. J. Mekalanos.** 1987. Cholera toxin transcriptional activator *toxR* is a transmembrane DNA binding protein. *Cell* **48**:271-9.
46. **Ohnishi, M., K. Kurokawa, and T. Hayashi.** 2001. Diversification of *Escherichia coli* genomes: are bacteriophages the major contributors? *Trends Microbiol* **9**:481-5.
47. **Provence, D. L., and R. Curtiss, III.** 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect Immun* **60**:4460-7.
48. **Restieri, C., G. Garriss, M. C. Locas, and C. M. Dozois.** 2007. Autotransporter encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol*.
49. **Richer, E., P. Courville, I. Bergevin, and M. F. Cellier.** 2003. Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria. *J Mol Evol* **57**:363-76.
50. **Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, M. K. Fakhr, and L. K. Nolan.** 2005. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**:2097-110.
51. **Rodriguez-Siek, K. E., C. W. Giddings, C. Doetkott, T. J. Johnson, and L. K. Nolan.** 2005. Characterizing the APEC pathotype. *Vet Res* **36**:241-56.
52. **Roos, V., G. C. Ulett, M. A. Schembri, and P. Klemm.** 2006. The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. *Infect Immun* **74**:615-24.
53. **Runyen-Janecky, L., E. Dazenski, S. Hawkins, and L. Warner.** 2006. Role and regulation of the *Shigella flexneri* Sit and MntH systems. *Infect Immun* **74**:4666-72.
54. **Runyen-Janecky, L. J., and S. M. Payne.** 2002. Identification of chromosomal *Shigella flexneri* genes induced by the eukaryotic intracellular environment. *Infect Immun* **70**:4379-88.
55. **Runyen-Janecky, L. J., S. A. Reeves, E. G. Gonzales, and S. M. Payne.** 2003. Contribution of the *Shigella flexneri* Sit, *luc*, and *Feo* iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells. *Infect Immun* **71**:1919-28.
56. **Sabri, M., S. Léveillé, and 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**:745-58.
57. **Saitou, N., and M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* **4**:406-25.
58. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
59. **Schouler, C., F. Koffmann, C. Amory, S. Leroy-Setrin, and M. Moulin-Schouleur.** 2004. Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain of O2 serogroup. *Microbiology* **150**:2973-84.
60. **Schwartz, C. E., J. Krall, L. Norton, K. McKay, D. Kay, and R. E. Lynch.** 1983. Catalase and superoxide dismutase in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* **258**:6277-81.
61. **Skyberg, J. A., T. J. Johnson, J. R. Johnson, C. Clabots, C. M. Logue, and L. K. Nolan.** 2006. Acquisition of avian pathogenic *Escherichia coli* plasmids by a commensal *E. coli* isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney. *Infect Immun* **74**:6287-92.
62. **Smith, H. W.** 1974. A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of *Escherichia coli*: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled

- lethal character closely associated, or identical, with colicine V. *J Gen Microbiol* **83**:95-111.
63. **Snyder, J. A., B. J. Haugen, E. L. Buckles, C. V. Lockett, D. E. Johnson, M. S. Donnenberg, R. A. Welch, and H. L. Mobley.** 2004. Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infect Immun* **72**:6373-81.
 64. **Tivendale, K. A., J. L. Allen, C. A. Ginns, B. S. Crabb, and G. F. Browning.** 2004. Association of *iss* and *iucA*, but not *tsh*, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **72**:6554-60.
 65. **Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch, and S. M. Payne.** 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun* **69**:6179-85.
 66. **Wei, J., M. B. Goldberg, V. Burland, M. M. Venkatesan, W. Deng, G. Fournier, G. F. Mayhew, G. Plunkett, III, D. J. Rose, A. Darling, B. Mau, N. T. Perna, S. M. Payne, L. J. Runyen-Janecky, S. Zhou, D. C. Schwartz, and F. R. Blattner.** 2003. Complete genome sequence and comparative genomics of *Shigella flexneri* serotype 2a strain 2457T. *Infect Immun* **71**:2775-86.
 67. **Welch, R. A., V. Burland, G. Plunkett, III, 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, and F. R. Blattner.** 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:17020-4.
 68. **Zhou, D., W. D. Hardt, and J. E. Galan.** 1999. *Salmonella typhimurium* encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island. *Infect Immun* **67**:1974-81.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

Strain or plasmid	Characteristics ^a	Reference or source
<i>E. coli K-12 strains</i>		
BW25113	<i>rrnB3ΔlacZ4787hsdR514 Δ□ araBAD)</i> <i>Δ□ rhaBAD)568 rph-1</i>	[351]
DH5α	F ⁺ λ ⁺ φ80 Δ(<i>lacZYA-argF</i>) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i>	Invitrogen
JW3372	BW25113 Δ <i>feoB</i> :: <i>kan</i> , Km ^R	[351]
JW3933	BW25113 Δ <i>oxyR</i> :: <i>kan</i> , Km ^R	[351]
JW4023	BW25113 Δ <i>soxS</i> :: <i>kan</i> , Km ^R	[351]
MGN-617	<i>thi thr leu tonA lacY glnV supE ΔasdA4</i> <i>recA</i> ::RP4 2-Tc:: Mu [λpir] Km ^R	(16)
APEC χ7122 and derivatives :		
χ7122	Wild-type APEC O78:K80:H9, <i>gyrA</i> Nal ^R	[331]
QT51	χ7122 Δ <i>lacZYA</i> Nal ^R	[373]
QT205	χ7122 Δ <i>sitABCD</i> :: <i>tetAR</i> , Tc ^R	[77]
QT770	QT205::pIJ93, <i>sitABCD</i> single copy integrant	This study
QT877	χ7122 Δ <i>feoB</i> :: <i>kan</i> , Nal ^R Km ^R	This study
QT878	χ7122 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i> , Nal ^R Km ^R	[77]
QT1239	QT205 Δ <i>mntH</i> :: <i>kan</i> , Tc ^R Nal ^R Km ^R	[77]
QT1240	QT205 Δ <i>feoB</i> :: <i>kan</i> , Tc ^R Nal ^R Km ^R	This study
QT1517	QT878 Δ <i>mntH</i> ::FRT, Nal ^R	
QT1539	QT1517 Δ <i>feoB</i> :: <i>kan</i> , Nal ^R Km ^R	This study
Plasmids		
pACYC184	p15A replicon cloning vector, Cm ^R Tc ^R	[334]
pCP20	FLP helper plasmid. Ts replicon, Ap ^R Cm ^R	[315]
pGP704	<i>oriR6K</i> , <i>mobRP4</i> , Ap ^R	[374]
pIJ28	8 kb HindIII fragment containing <i>sitABCD</i> from χ7122 cloned into pACYC184, Cm ^R	[77]
pIJ93	<i>sitABCD</i> genes from pIJ28 cloned into pGP704	This study
pKD46	λ red recombinase plasmid, Ts replicon, Ap ^R	[315]

^a Ap, ampicillin; Cm, chloramphenicol; Km, kanamycin; Nal, naladixic acid, Tc, tetracycline, Ts, temperature-sensitive.

TABLE 2. Distribution of *sit*-positive strains within phylogenetic groups among the ECOR collection and *Escherichia coli* clinical isolates.

Phylogenetic group	ECOR collection		Clinical isolates:			
	Total no. strains	<i>sit</i> -positive ^a (%)	ExPEC		Diarrheogenic	
			no. of isolates	<i>sit</i> -positive (%)	no. of isolates	<i>sit</i> -positive (%)
A	25	5 (20)	6	6 (100)	12	1 (8.3)
B1	16	7 (43.8)	0	0	8	1 (12.5)
B2	15	15 (100) ^b	20	20 (100)	1	0
D	12	6 (50)	6	6 (100)	2	0
other	4	1 (25)	NA ^c	NA	NA	NA
Total	72	34 (47.2)	32	32 (100)^d	23	2 (8.7)

^a Positive PCR amplification using the *sitA* and *sitD* primer pairs.

^b Among the ECOR collection *sit* was significantly associated with group B2 compared to any other phylogenetic group (P<0.005)

^c NA= not applicable

^d *sit* was significantly associated with ExPEC strains compared to diarrheogenic *E. coli* or the ECOR collection strains (P<0.0001).

TABLE 3. Distribution of *sit* genes among avian pathogenic *E. coli* (APEC) and avian commensal fecal isolates according to the lethality class.

Lethality class	<i>E. coli</i> isolates			
	APEC		Commensal fecal isolates	
	Total no. isolates	No. <i>sit</i> -positive isolates ^a (%)	Total no. isolates	No. <i>sit</i> -positive isolates ^a (%)
LC1 ^b	221	218 (99) ^c	1	0 (0)
LC2	38	31 (82)	12	5 (42)
LC3	38	26 (68)	19	9 (47)
Total	297	275 (93)^d	32	14 (44)

^a Positive PCR amplification using the *sitA* and *sitD* primer pairs.

^b Lethality classes (LC) were defined as follows: LC1, 50% lethal dose (LD50) < 10⁸ CFU; LC2, LD50 ≥ 10⁸ CFU; LC3, not lethal at ≥ 10⁸ CFU [78].

^c *sit* sequences were significantly associated with APEC isolates from LC1 as compared to APEC isolates from either LC2 or LC3 (P<0.001).

^d *sit* sequences were significantly associated with APEC isolates as compared to commensal fecal isolates (P<0.001).

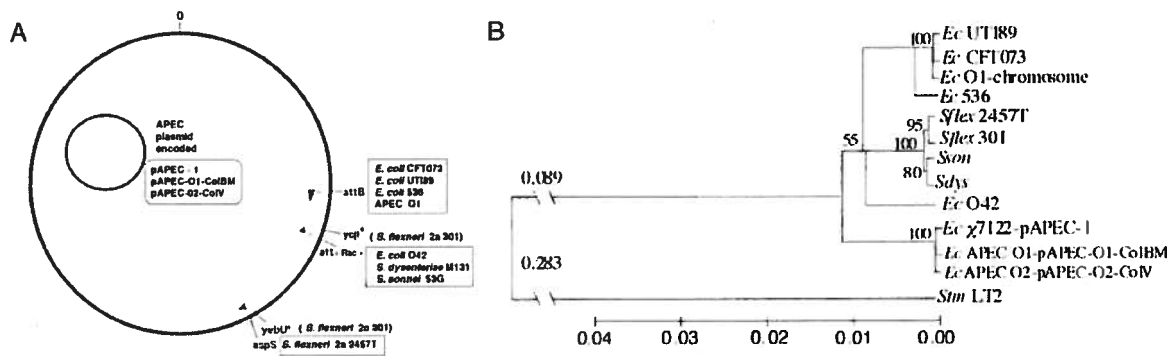


Figure 1. (A) Map location of *sit* genes in *E. coli* and *Shigella* strains. The large circle represents the *E. coli* K-12 MG1655 genome as a comparative reference, with 0 indicating the start of the sequence. The insertion locations corresponding to *E. coli* K-12 are indicated on the outer perimeter. The inner black arrows represent the genomic islands and the orientation of the *sit* genes in different pathogenic strains. The outer grey arrows indicate corresponding e14 and Rac prophage elements located in these same regions in strain MG1655. The asterisks (*) denote the *E. coli* K-12 corresponding genes flanking either side of shigella island (SI) #19, the genomic island encompassing the *sit* genes in *S. flexneri* 2a strain 301 [314]. (B) Phylogenetic tree of the *sitABCD* genes from *E. coli* and *Shigella* spp. constructed using the neighbor-joining method using MEGA3 software [353]. *Ec*: *Escherichia coli*; *Sflex*: *Shigella flexneri*, *Sson*: *Shigella sonnei* 53G; *Sdys*: *Shigella dysenteriae* M131; The full length sequences spanning from the *sitA* start codon to the *sitD* stop codon from each sequence were analyzed, and *sitABCD* genes from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium LT2 were used as the outlier sequence. Distances were calculated using the Jukes and Cantor estimate, which assumes a uniform rate of nucleotide substitutions. Branch lengths are indicated on the scale or above branches that are off the scale. Bootstrap confidence levels are indicated adjacent to the nodes. *sit* sequence data were obtained from NCBI Genbank accession numbers: AY598030 (pAPEC-1 of *E. coli* χ 7122) [77], AY545598 (*E. coli* APEC O2, pAPEC-O2-CoIV) [361], DQ381420 (*E. coli* APEC O1, pAPEC-

O1-ColIBM) [342], NC_004431 (*E. coli* CFT073) [71], NC_008563 (*E. coli* APEC O1) [341], NC_007946 (*E. coli* UTI89) [338], NC_008253 (*E. coli* 536) [337], NC_004337 (*S. flexneri* 2a 301) [314], NC_004741 (*S. flexneri* 2a 2457T) [313], NC_003197 (*S. enterica* LT2) [375] or from *coli*BASE [349] (<http://colibase.bham.ac.uk/>) for *E. coli* O42, *Shigella dysenteriae* M131, and *Shigella sonnei* 53G. Data available from *coli*BASE were produced by the Sequencing Group at the Sanger Institute (http://www.sanger.ac.uk/Projects/Escherichia_Shigella/).

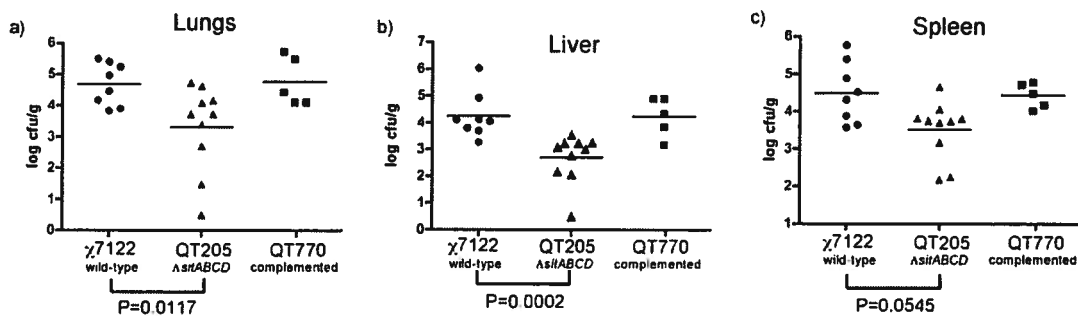


Figure 2. Colonization of extra-intestinal organs of chickens by APEC strain χ 7122 and derivatives in the single-strain infection model. Data are presented as the log CFU/gram of tissue. Each data point represents a tissue sample from an individual infected chicken 48 hours post-infection. Organs sampled were the lungs (a), liver (b), and spleen (c). Strains tested were wild-type APEC strain χ 7122 (●) QT205 (Δ sitABCD) (▲) and QT770 (QT205::*sit*ABCD) (■). P values of comparative differences in colonization by QT205 and the wild-type strain as determined by the Mann-Whitney test are indicated below the X-axes.

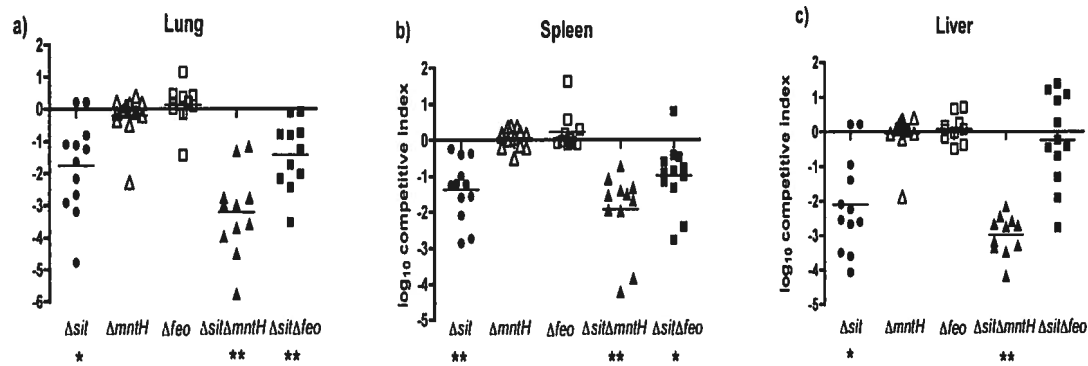


Figure 3. Comparative colonization of chicken tissues by APEC χ 7122 derivatives lacking Sit, MntH, or Feo metal transporters and virulent χ 7122 Δ lac derivative strain QT51. A competitive co-infection model was used in which a mixture of QT51 and different metal transporter mutants were inoculated simultaneously. 48 hours post-infection, tissues were sampled and results are presented as the \log_{10} competitive index (CI). The CI represents the relative numbers of the two test strains from the tissues sampled (the output ratio) compared to the initial numbers of each strain in the inoculum (input ratio). Negative CI values indicate a decreased capacity for the mutant to compete with the virulent test strain QT51. Horizontal bars indicate the mean \log_{10} CI values. Each data point represents a sample from an individual chicken. From 10-12 chickens were used for each infection group. Organs sampled were the lungs (a), spleen (b), and liver (c). Strains tested were QT205 (Δ sitABCD) (●), QT878 (Δ mntH) (△), QT877 (Δ feoB) (□), QT1239 (Δ sitABCD Δ mntH) (▲), and QT1240 (Δ sitABCD Δ feoB) (■). Statistically significant decreases in CI values are indicated with asterisks (* $P < 0.005$, ** $P < 0.001$) as determined by the Wilcoxon matched pairs test.

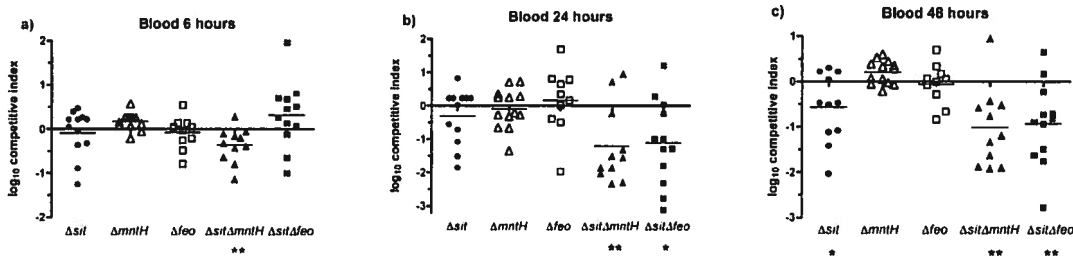


Figure 4. Comparative persistence of APEC χ 7122 derivatives lacking Sit, MntH, or Feo metal transporters and virulent χ 7122 Δlac derivative strain QT51 in the blood of infected chickens. Experiments were conducted using a co-infection model as described in Figure 3. Blood was sampled at 6 hours (a), 24 hours (b), and 48 hours (c) post-infection. Strains tested were QT205 ($\Delta sitABCD$) (●), QT878 ($\Delta mntH$) (△), QT877 ($\Delta feoB$) (□), QT1239 ($\Delta sitABCD \Delta mntH$) (▲), and QT1240 ($\Delta sitABCD \Delta feoB$) (■). Statistically significant decreases in CI values are indicated with asterisks (* $P < 0.005$, ** $P < 0.001$) as determined by the Wilcoxon matched pairs test.

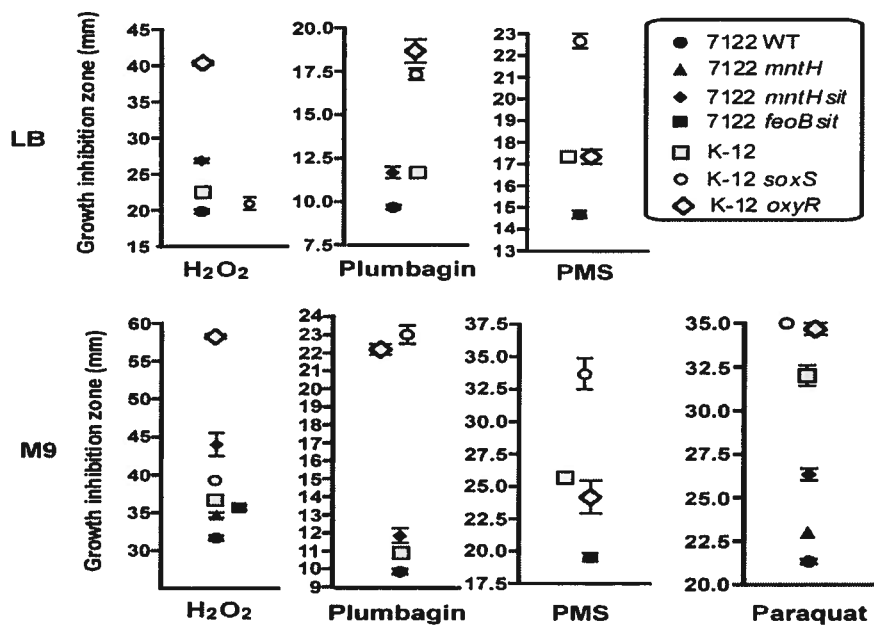


Figure 5. Sensitivity of wild-type APEC strain χ 7122 and isogenic metal transport mutants to reactive oxygen intermediate (ROI)-generating compounds. Strains were grown on either LB agar or M9 agar and tests were performed as described in materials and methods. ROI-generating compounds tested were 30% hydrogen peroxide (H₂O₂), 53 mM plumbagin, 15 mM phenazine methosulphate (PMS) or phenazine ethosulphate (PES), and 40 mM paraquat. Paraquat was ineffective against all strains grown on LB medium even at higher concentrations (up to 200 mM). Sensitivity to PES was similar to sensitivity to PMS (not shown). Results represent the means of replicate experiments from a minimum of three samples. Vertical bars represent the standard errors of the means. Only wild-type (WT) strain χ 7122 and its mutant derivatives that demonstrated a significant increase ($P < 0.05$) in sensitivity to ROI-generating products are indicated.

Article 3

Soumis à *Infection and Immunity*.

Titre : Rôle des transporteurs de zinc ZnuACB et ZupT pendant l'infection du tractus urinaire par les souches extra-intestinales pathogènes d'*E. coli* (ExPEC).

Résumé : Les rôles des transporteurs ZnuACB et ZupT ont été étudiés lors de la croissance et de l'accumulation du zinc chez *E. coli* K-12 et la souche uropathogène d'*E. coli* (UPEC) CFT073. Les mutants $\Delta znu\Delta zupT$ d'*E. coli* K-12 et CFT073 n'ont pas été capables de croître sur milieu minimal et ont été déficients dans le transport de $^{65}\text{Zn}^{2+}$. Le mutant de Δznu CFT073 a démontré une croissance plus faible sur milieu minimal et une baisse marquée de l'accumulation du $^{65}\text{Zn}^{2+}$, alors que le mutant de $\Delta zupT$ CFT073 avait une croissance égale à celle de la souche parentale en milieu minimal et présentait une baisse moins marquée de l'accumulation du $^{65}\text{Zn}^{2+}$. Les mutants de CFT073 poussaient bien dans l'urine humaine et dans les milieux minimaux supplémentés avec du zinc. Lors des co-infections dans le modèle expérimental murin, la souche Δznu UPEC a été atténuée dans la vessie (facteur moyen de 4,4; $P=0,0005$) et les reins (facteur moyen de 41; $P<0,0001$), alors que le mutant $\Delta zupT$ colonisait aussi bien que le type sauvage. Le mutant $\Delta znu\Delta zupT$ présentait la baisse la plus marquée de la colonisation (facteur moyen de baisse 30 et 48 comparativement au type sauvage dans la vessie et les reins respectivement). La complémentation du mutant $\Delta znu\Delta zupT$ avec les gènes *znuACB*, a rétabli sa capacité à croître sur des milieux déficients en Zn et à coloniser la vessie et les reins. La perte des systèmes de transport du zinc a été liée à la baisse de la motilité et la résistance au peroxyde d'hydrogène qui ont pu être rétablies par une supplémentation en zinc. Les résultats suggèrent que Znu est le transporteur prédominant du zinc dans la souche CFT073 et que la perte de Znu et ZupT a un effet cumulatif sur la capacité bactérienne de persister lors des infections du tractus urinaire (ITUs), ce qui pourrait être relié à la résistance réduite au stress oxydatif et à la motilité basse dans des conditions de limitation en zinc.

Role of the extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) ZnuACB and ZupT zinc transporters during urinary tract infection

Running title: **Role of zinc transporters for *E. coli* UTI**

Mourad Sabri, Sébastien Houle and Charles M. Dozois.

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

*Corresponding Author:

Charles M. Dozois

Canada Research Chair on Infectious Bacterial Diseases

INRS-Institut Armand-Frappier

531 boul. des Prairies

Laval, Québec, CANADA H7V 1B7

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

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

Abstract

Roles of the ZnuACB and ZupT transporters were assessed in *E. coli* K-12 and uropathogenic *E. coli* (UPEC) CFT073. K-12 and CFT073 $\Delta znu\Delta zupT$ mutants demonstrated decreased $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake and growth on minimal medium. CFT073 Δznu demonstrated an intermediate decrease of $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake and growth in minimal medium, whereas the CFT073 $\Delta zupT$ mutant grew as well as CFT073, and exhibited a less marked decrease in $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake. CFT073 mutants grew as well as the wild-type in human urine. In competitive infections in CBA/J mice, the $\Delta zupT$ mutant demonstrated no disadvantage during UTI. By contrast, the UPEC Δznu and $\Delta znu\Delta zupT$ strains demonstrated significantly reduced colonization of the bladders (mean 4.4-fold and 30-fold reduction respectively) and kidneys (mean 41-fold and 48-fold reduction respectively). In addition, in single-strain infection experiments, the Δznu and $\Delta znu\Delta zupT$ mutants were less able to colonize the kidneys ($P=0.0012$ and $P<0.0001$ respectively). Complementation of the CFT073 $\Delta znu\Delta zupT$ mutant with the *znuACB* genes restored growth in Zn-deficient medium and an increased capacity to colonize the bladder and kidneys. The loss of the zinc transport systems decreased both motility and resistance to hydrogen peroxide, which could be restored by supplementation with zinc. Overall, results indicate that : Znu and ZupT are required for growth in zinc limited-conditions; Znu is the predominant zinc transporter; and loss of Znu and ZupT has a cumulative effect on fitness during UTI, which may in part be due to reduced resistance to oxidative stress and motility.

Introduction:

Escherichia coli is a versatile bacterial species comprised of innocuous and pathogenic strains [376]. Pathogenic *E. coli* cause intestinal or extra-intestinal infections in humans and other animals [75]. Extra-intestinal pathogenic *E. coli* (ExPEC) cause an array of diseases including urinary tract infections (UTIs), neonatal meningitis, and septicemia [48]. ExPEC associated with UTIs are termed uropathogenic *E. coli* (UPEC). In the United States alone, there are an estimated 11.3 million cases of community acquired UTIs costing over 1.6 billion \$ annually, and 80% of these UTIs are caused by *E. coli* [377]. *E. coli* and other bacteria contain a variety of transport mechanisms for the acquisition of essential transition metals such as iron, manganese, and zinc [16, 20, 21]. During infection, pathogenic bacteria are often faced with limited availability of transition metals which are sequestered by host cells [123, 170, 378-380]. This is exemplified by the host sequestration of iron by iron-binding proteins such as transferrin or lactoferrin [381], and similar but less documented mechanisms also exist for other metals [44, 45, 382].

Compared to *E. coli* K-12 and other commensal strains, ExPEC strains encode in their genomes a greater variety of characterized as well as putative metal transport systems [71, 337, 338, 341]. The importance of pathogen-specific iron transport systems for ExPEC has been established [225, 228, 229, 261, 262, 383]. However, the importance of other metal transport systems in ExPEC is less well characterized, and in particular nothing has been reported on the potential implication of the zinc transporters for the virulence of ExPEC.

Zinc (Zn^{2+}) is an essential micronutrient in all living cells, as this transition metal is a component of numerous metalloproteins and serves as an enzymatic cofactor or a structural element [98]. In mammals Zn^{2+} has an important immunomodulatory function and is critical for

innate and acquired immunity [109]. Following exposure to LPS, zinc levels are decreased in the serum, and zinc is accumulated in the liver [44]. In addition, during bacterial infection, the host protein calprotectin is released by neutrophils and may reduce bacterial numbers by restricting the availability of metals including zinc and manganese [45, 384, 385]. As well, although zinc concentrations are estimated to be in the millimolar range within host cells, available zinc may be mostly inaccessible to bacterial pathogens [55] and/or dramatically reduced following activation of innate immune defences [109]. Hence, as is the case for iron and other nutrients which may be limited or sequestered by the host [386], zinc homeostasis in the host is tightly controlled [109], and zinc availability and sequestration are clearly implicated in the outcome of host-pathogen interactions.

In bacteria, uptake of zinc is mediated by two major types of transporters: ZnuACB, which belongs to the cluster C9 family of (TroA-like) ATP-binding cassette (ABC) transporters [21, 63] and ZupT, which is a member of the ZIP (ZRT/IRT-like Protein) family of transporters that are also present in eukaryotes [21]. Thus far, the Znu transport system has been shown to be important for virulence in a number of bacterial pathogens including *Salmonella enterica*, *Brucella abortus*, and *Haemophilus ducreyi* [55, 57, 199, 200]. Currently, the roles of the Znu and ZupT transporters for ExPEC virulence have not been investigated.

The genomes of all *E. coli* strains that have been sequenced thus far contain genes encoding the two described zinc transporters: ZupT and ZnuACB. In addition to transport of zinc, ZupT can also mediate the uptake of Co^{2+} , Fe^{2+} and Mn^{2+} [188]. The exact mechanism by which ZupT mediates metal uptake is currently unknown, although it may involve a chemiosmotic transmembrane gradient [187, 188]. Zinc uptake mediated by the Znu system requires hydrolysis of ATP by ZnuC to transport Zn^{2+} captured by the periplasmic binding protein ZnuA through the pore in the cytoplasmic membrane formed by a ZnuB dimer [173,

182]. In ExPEC strains, the SitABCD transport system represents an additional ABC transporter belonging to the C9 (TroA-like) cluster [234]. Sit transporters have thus far been characterized as manganese and iron transporters [59, 77, 236], although zinc has been shown to be an effective competitive inhibitor of manganese or iron uptake by SitABCD [59, 236]. The SitA periplasmic binding protein also shares similarities to the TroA periplasmic binding protein of *Treponema pallidum*, which has been shown to bind both zinc and manganese with essentially equal affinities [30]. It remains to be determined whether in addition to Znu and ZupT transporters, SitABCD or any other undefined transport systems may contribute to zinc transport or the virulence of ExPEC.

In this report, the roles of the Znu, ZupT and SitABCD transport systems for zinc uptake and growth in zinc restricted medium were compared in an *E. coli* K-12 $\Delta znu\Delta zupT$ mutant. In addition, the roles of the Znu and ZupT transporters, for growth of ExPEC strain CFT073 in zinc restricted conditions and for colonization in the murine ascending UTI model were assessed. Results suggest that Znu is the predominant zinc transporter in ExPEC strain CFT073, and that combined loss of Znu and ZupT transporters have a cumulative effect of decreased fitness during UTI. Loss of these transporters was also shown to increase sensitivity to oxidative stress and decrease motility in a zinc-dependent fashion. Taken together, these results suggest that other than Znu and ZupT, there are no additional efficient zinc transporters present in ExPEC strain CFT073 and that during UTI. The decreased fitness in the absence of these transport systems may at least partially be due to reduced motility and resistance to oxidative stress under conditions of zinc limitation.

Materials and Methods:

Bacterial strains, plasmids, media, and growth conditions.

Bacterial strains and plasmids used in this study are listed in Table 1. Strains were routinely cultured overnight in Luria-Bertani (LB) broth or on Luria-Bertani-agar (15 g/L agar) at 37°C and stored in 25% glycerol LB broth at -80°C. Antibiotics were added as required at the following concentrations: kanamycin (30 µg/ml); ampicillin (100-200 µg/ml); chloramphenicol (30 µg/ml); and tetracycline (10 µg/ml).

PCR and gene cloning.

Primers used for PCR reactions are presented in Table 2. PCR was used to amplify *znuACB* and *zupT* genes from *E. coli* K-12 strain MG1655. PCR was also used to create and confirm all the mutant genotypes throughout this study. The templates used for PCR amplification were either crude lysates of bacterial strains or diluted plasmid DNA. An Eppendorf® Mastercycler Gradient PCR cycler was used to amplify all PCR fragments. NEB Taq DNA-polymerase (New England Biolabs®-NEB®) was used for routine PCR amplifications (confirmation of mutant alleles) and the high-fidelity Herculase DNA-polymerase (Stratagene®) was used for amplification of fragments that were cloned into plasmid vectors. A 5 µl volume of each bacterial cell lysate or 1 µl aliquot of plasmid DNA was added to a PCR reaction mixture of a final volume of 25 µl containing 6.25 pmol of each primer, 5 nmol of each dNTP, and 0.5 U of either *Taq* polymerase or Herculase in 1X buffer. PCR conditions were as follows: 95°C for 1 min followed by 30 cycles of 94°C for 30 s, 54°C for 30 s, 72°C for 1 min, and then an extension period of 72°C for 1 min. Restriction endonuclease *Hind*III and T4 DNA-ligase were purchased from NEB®. Plasmid DNA was purified using Qiagen® purification kits according to the supplier's protocol.

Plasmid pIJ156, containing the *znuACB* genes, was obtained by ligating a *Hind*III digested fragment obtained by PCR using primers CMD637 and CMD638 (Table 2) into the *Hind*III site of pACYC184. Similarly, pIJ202 containing *zupT*, was obtained by ligating a *Hind*III digested PCR product obtained using primers CMD717 and CMD718 into *Hind*III digested pACYC184 plasmid vector. The cloned inserts of plasmids pIJ156 and pIJ202 were sequenced at Génome Québec, McGill University and were confirmed to be identical to MG1655 genomic sequences of *znuACB* and *zupT* genes respectively. The suicide plasmid for single copy complementation of *znuACB* genes, pIJ254, was constructed by digestion of plasmid pIJ156 with *Xba*I and *Eco*RV and ligation of the appropriate fragment into the same restriction sites of plasmid pGP704.

Construction of mutant strains.

All mutants were made using one-step PCR fragment-mediated λ -Red recombination mutagenesis [315]. The *znuA::kan* mutant allele was amplified directly from strain JW5831 ($\Delta znuA::kan$) [351] using primers CM264 and CMD265 (Table 2) to generate $\Delta znuA::kan$ derivatives of K-12 strain MG1655 (QT1369) and UPEC strain CFT073 (QT1377) by recombination-mediated allelic exchange using plasmid pKD46 [315]. The kanamycin cassettes which are flanked by FRT sites were lost in these strains through FLP-mediated excision using plasmid pCP20, generating strains QT1370 (MG1655 $\Delta znuA::FRT$) and QT1434 (CFT073 $\Delta znuA::FRT$). The *zupT::kan* allele was obtained using primers CMD715 and CMD 716 and specific amplification of the allele from the template plasmid pKD13. This allele was introduced to strains MG1655 and CFT073 as described above, generating strains QT1553 (MG1655 $\Delta zupT::kan$) and QT1554 (CFT073 $\Delta zupT::kan$). Similarly, the $\Delta zupT::kan$ allele was also introduced to the $\Delta znuA::FRT$ mutants to generate $\Delta znuA::FRT \Delta zupT::kan$ double mutant strains

MG1655 (QT1435) and CFT073 (QT1555). A $\Delta sit::tetAR$ allele amplified from APEC QT205 [234] with primers CMD21 and CMD 42 was used to generate strains QT1640 (CFT073 $\Delta znuA::FRT \Delta sit::tet$) and QT1634 (CFT073 $\Delta znuA::FRT \Delta zupT::kan \Delta sit::tet$). Strain QT1932, the UPEC *znuACB* complemented $\Delta znuA::FRT \Delta zupT::kan$ derivative of CFT073, was obtained by conjugation of suicide plasmid pIJ254 into strain QT1555 using previously described methods [234]. UPEC strain QT1081 (CFT073 $\Delta lacZYA$) was generated as previously described for strain $\chi 7122$ [373].

Growth in minimal media and ion rescue:

All media used for growth assays were made using the purest available water processed with the Milli-Q water purification system (Millipore®) and were prepared in polypropylene labware rinsed three times with Milli-Q water. M9-glucose medium and M9-glucose agar (using 1.5% Noble agar from Sigma®) were used as a defined minimal metal limited medium to assess the growth of strains. For growth in a complex minimal medium, DT-glucose (Diluent Tryptone) was used as described previously, except that it was supplemented with 200 μM of the metal-chelator EGTA [77]. EGTA affinity constants for Mn^{2+} , Fe^{3+} and Zn^{2+} , taken from the NIST critically selected stability constants of metal complexes database are; $\log K = 12.2$ (Mn^{2+}), $\log K = 20$ (Fe^{3+}) and $\log K = 12.6$ (Zn^{2+}). Growth of *E. coli* strains was assessed in DT-EGTA or M9-glucose broth. Briefly, following growth in rich LB medium, the strains were pre-cultured in the appropriate minimal medium overnight. The following day, the strains were adjusted to an OD_{600} of 0.02. Growth as measured at OD_{600} was monitored every two hours. All strains were tested in triplicate. Metal supplements (5 μM of either ZnCl_2 , MnCl_2 , or FeCl_2) were added to determine the effects of ion rescue on growth of strains. Human urine, pooled from three healthy

women and sterile filtered was also used in this study to characterize growth of strain CFT073 and its mutant derivatives. LB broth was used as the metal replete rich medium.

Isotope uptake:

Zinc, $^{65}\text{Zn}^{2+}$, isotope uptake was determined in the *E. coli* K-12 zinc transport-deficient ($\Delta znuA::\text{FRT}\Delta zupT::kan$) strain derivative of MG1655 (QT1435) transformed with plasmids pIJ156 (*znuACB*), pIJ202 (*zupT*), pIJ28 (*sitABCD*) or pACYC184 (vector control) and the mutant derivatives of UPEC strain CFT073 lacking functional Znu, ZupT, and/or Sit transporters. All strains were grown in DT broth overnight. The following day, the strains were suspended in DT-EGTA (200 μM) for two hours at 37°C with moderate shaking. The strains were washed three times with DT-EGTA (500 μM) and adjusted at $\text{OD}_{600} = 0.5$ (corresponding to 10^8 cells / ml). Zinc isotope $^{65}\text{Zn}^{2+}$ was added at a concentration of 20 nM. The strains were left in the presence of the isotope for 15 min at 37°C. One ml samples of the strain/isotope suspension in DT-EGTA were distributed in 2 ml Eppendorf tubes. Triplicates of each strain were prepared, and samples were washed three times with cold DT-EGTA (1 mM) for two minutes and resuspended in Wallac Optiphase scintillation buffer. Scintillations counts were read on the channels 0-748 of the LS1701 scintillation counter (Beckmann). Samples from the zinc-transport deficient strain without isotope were used as a blank to determine the value of the background which was subsequently subtracted. A triplicate of samples containing 100 μl of 20 nM $^{65}\text{Zn}^{2+}$ DT-EGTA without bacterial cells was used as a standard to convert the value of the uptake from CPM to pmol / 10^8 cells.

Oxidative stress resistance:

Oxidative stress resistance against hydrogen peroxide (30% vol/vol) using a disk diffusion assay were done using strain CFT073 and its mutant derivatives as previously described. [234]

Motility assay:

Motility assays were done using strain CFT073 and its mutant derivatives as previously published [387], except that all the strains screened for motility were washed three times with M9 medium prior to inoculation on motility agar plates. The motility area was measured after 18 h of growth at 37°C.

Experimental UTI in CBA/J mice:

A murine ascending urinary tract infection (UTI) model was used in which a virulent $\Delta lacZYA$ derivative of UPEC CFT073 (strain QT1081) was co-infected with the different metal transporter mutants. Six-week-old CBA/J female mice were co-infected with 25 μ l (10^9 CFU) of a mixed culture containing near equal amounts of two test strains through a catheter inserted in the urethra. The infected animals were euthanized 48 h post-infection and the bacterial counts of the bladders and kidneys were determined on MacConkey agar plates, which allowed for direct comparison of the virulent Δlac CFT073 derivative (white colonies) and the metal transport mutants (red colonies). Competitive indexes (CI= mutant CFU/ Δlac CFT073) were calculated for each sample and normalized for the input ratio of the inoculum. The log CI values were used for graphical representation, with negative log CI values indicating a decreased capacity of the transport mutant to compete with the virulent UPEC CFT073 derivative. In the single-strain experimental UTI model, individual groups of CBA/J mice were infected as described above but with pure cultures of each strain, and 48h post-infection bacterial counts were determined from the bladders and kidneys.

Statistical analyses:

All data were analysed using GraphPad Prism 4 software. The Wilcoxon Signed Rank Test (two tailed P value ≤ 0.05) was used to determine statistical significance in the log CI values

between groups in the competitive-infection experiments. The Mann-Whitney test was used to determine significant differences between groups in single-strain infection experiments.

Results:

Individual contribution of metal transport systems to the growth of *E. coli* zinc transport-deficient mutants.

To investigate the individual roles of the Znu, ZupT, and SitABCD transport systems for growth in medium with limited zinc availability (DT-EGTA), genes encoding these systems on plasmid pACYC184 were introduced into *E. coli* K-12 MG1655 derivative strain QT1435, which lacks the known zinc transporters ZnuACB and ZupT. Strain QT1435 containing the pACYC184 vector alone failed to grow in DT-EGTA (Fig. 1a). By contrast, strain QT1435 complemented with either *znuACB* (pIJ156) or *zupT* (pIJ202) regained growth in this medium. By comparison, introduction of the *sitABCD* genes (pIJ28), encoding a manganese/iron transport system, conferred a limited and late increase in growth (Fig.1a). All of the mutant strains grew well in DT-EGTA medium supplemented with 5 μM of ZnCl_2 , suggesting that the growth defect of the *znu/zupT* mutant was due to the lack of available Zn^{2+} (Fig. 1 b). In addition, when cultured on M9-glucose plates, strain QT1435 only grew when complemented with either the *znuACB* (pIJ156) or *zupT* (pIJ202) genes, whereas complementation with the *sitABCD* genes (pIJ28) did not restore growth.

The CFT073 $\Delta znu\Delta zupT$ mutant, QT1555, also failed to grow on M9-glucose plates. Compared to the wild-type parent, the $\Delta zupT$ mutant QT1554 grew as well, whereas the Δznu strain QT1370 formed smaller colonies on M9-glucose plates (data not shown). The CFT073 Δznu mutant also exhibited a marked lag and general decreased growth in M9-glucose medium

(Fig.2a). Additional loss of the *sit* genes from the Δznu strain had no discernable effect on growth. (Fig. 2a). The $\Delta zupT$ mutant (QT1554) demonstrated no growth defect compared to the wild-type parent strain, whereas the $\Delta znu\Delta zupT$ mutant (QT1555) grew very poorly in M9 medium, and the additional loss of the *sitABCD* genes resulted in a complete loss of growth of strain QT1634. (Fig. 2a) Supplementation of M9-glucose medium with 5 μM of Zn^{2+} restored the growth of the CFT073 $\Delta znu\Delta zupT$ mutant (86 % growth of the wild-type at 24h) , whereas addition of Fe^{2+} only slightly increased growth (27 % compared to wild-type at 24h incubation), and addition of Mn^{2+} had no appreciable effect (Fig. 2b). These results confirmed that the lack of Zn^{2+} in M9-glucose medium was likely responsible for the growth-deficient phenotypes observed for the Δznu and $\Delta znu\Delta zupT$ mutant derivatives of CFT073. Taken together, these results demonstrate that ZnuACB is the most important zinc transporter in CFT073, followed by ZupT whose role is secondary to ZnuACB. These results also indicate that SitABCD has a very limited (if any) role in Zn^{2+} transport by strain CFT073. Finally, these results also strongly suggest that in ExPEC strain CFT073, as in *E. coli* K-12, the Znu and ZupT systems are the only available transporters that can mediate sufficient zinc transport for growth. In contrast to minimal M9 medium all of the transport mutants grew well in LB medium.

Role of Znu, ZupT, and Sit metal transport systems for zinc transport:

We investigated the capacity of the Znu, ZupT, and Sit systems to transport zinc by comparing $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake in the *E. coli* K-12 $\Delta znu\Delta zupT$ strain QT1435, complemented with plasmids encoding the Znu or ZupT transporters and in mutant derivatives of UPEC strain CFT073 (Fig. 3). Strain QT1435 complemented with the vector control demonstrated only a background level of $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake. By contrast, complementation with plasmids encoding either Znu (pIJ156), or ZupT (pIJ202) systems conferred an increased uptake of $^{65}\text{Zn}^{2+}$. Further,

introduction of *sit* genes (pIJ28 plasmid) increased $^{65}\text{Zn}^{2+}$ accumulation, albeit at lower levels than the *Znu* or *ZupT* encoding plasmids (Fig. 3a). In uptake studies using UPEC strain CFT073 and mutant derivatives, loss of the *Znu* system resulted in the greatest decrease in $^{65}\text{Zn}^{2+}$ accumulation. The decrease in $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake observed was similar for the Δznu (QT1434), $\Delta znu\Delta zupT$ (QT1555) and $\Delta znu\Delta sitABCD$ (QT1640) strains, whereas loss of the *ZupT* system had a less marked effect on $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake (Fig. 3b). These results indicate that, despite its ability to acquire $^{65}\text{Zn}^{2+}$ when expressed from a medium-copy number plasmid (pIJ202), *ZupT* is a less efficient zinc transporter than the *ZnuACB* transporter when expressed at wild-type levels in UPEC strain CFT073. Finally, loss of *sit* in the *znu* mutant strain did not result in a cumulative reduction in $^{65}\text{Zn}^{2+}$ acquisition, suggesting that despite its ability to accumulate $^{65}\text{Zn}^{2+}$ when expressed from a medium-copy number plasmid (pIJ28), *SitABCD* does not contribute significantly to zinc acquisition by UPEC strain CFT073.

Contribution of the *Znu* and *ZupT* zinc transporters in the murine UTI model.

UPEC strain CFT073 zinc transporter mutants were tested in a murine co-infection model using a virulent $\Delta lacZYA$ CFT073 strain QT1081 as the competitor strain (Fig. 4). In this infection model, the $\Delta zupT$ mutant colonized the bladders and kidneys of infected mice as well as the virulent competitor strain, indicating that *zupT* alone does not contribute significantly to colonisation and survival during UTI. The Δznu mutant strain QT1434 was significantly attenuated, and compared to the virulent competitor strain, demonstrated a mean 4.4-fold reduction in the bladders ($P=0.0005$) and a mean 44-fold reduction in the kidneys ($P<0.0001$). Further, the $\Delta znu\Delta zupT$ strain (QT1555) was even more attenuated and demonstrated a mean 30-fold decrease in bladders ($P=0.0001$) and a mean 48-fold decrease in the kidneys ($P<0.0001$). Re-introduction of the *znuACB* genes into the $\Delta znu\Delta zupT$ strain, QT1932, resulted in

complementation as demonstrated by a significant increase in colonization of the bladder (P=0.001) and a complete regain in colonization of the kidneys (P<0.0001) compared to the attenuated $\Delta znu\Delta zupT$ mutant QT1555.

We also investigated the role of the zinc transporters in a single-strain infection model. The Δznu and $\Delta znu\Delta zupT$ mutant strains showed a significant decrease in colonization of the kidneys (P=0.0012 and P<0.0001 respectively), but colonized the bladder at levels similar to the virulent CFT073 Δlac strain (Fig. 5). Thus, taken together these results indicate that zinc transport systems impart a competitive advantage to ExPEC strain CFT073 during UTI in the murine model, and that the ZnuACB system plays a predominant role, whereas ZupT appears to be a zinc transporter of secondary importance.

As the zinc transporter mutants demonstrated a growth defect in zinc-limited medium (Figs. 1 and 2), we investigated whether the UPEC zinc transport mutants were less able to grow in human urine. Loss of either or both the Znu and ZupT systems in strain CFT073 did not effect growth of the strains in human urine (data not shown). Moreover, we performed competition assays between the zinc transport-deficient mutants and the CFT073 Δlac derivative in human urine in vitro. During competitive growth in human urine, the zinc transport mutants remained at levels similar to the CFT073 Δlac derivative, and after 24 hours the CI values were 0.92 for the Δznu (QT1434) strain and 0.78 for $\Delta znu\Delta zupT$ (QT1555) strain. These results suggest that the levels of zinc present in urine from healthy individuals were adequate for growth of the strains in vitro.

Zinc transporters contribute to resistance to H₂O₂.

As other metal transporters have been found to contribute to bacterial resistance to oxidative stress mediated by exogenous H₂O₂ [56, 77], we assessed whether loss of zinc

transporters increased susceptibility of strain CFT073 to H₂O₂ (Fig. 6). Compared to the wild-type strain, the Δznu mutant strain (QT1434) was more sensitive to H₂O₂, whereas the $\Delta zupT$ strain QT1554 was as resistant as the wild-type strain (Fig. 6a). Without zinc supplementation, the $\Delta znu\Delta zupT$ strain (QT1555) was unable to grow on the M9-glucose plates used for the assay. However, when QT1555 was complemented with the *znuACB* genes (strain QT1932) both growth and resistance to H₂O₂ were restored (Fig. 6a). Supplementation with 5 μ M zinc restored the growth of all strains, and was sufficient to restore resistance of the Δznu strain QT1434 to wild-type levels (Fig. 6b). By contrast, although the $\Delta znu\Delta zupT$ strain (QT1555) regained the capacity to grow when supplemented with 5 μ M zinc, it was even more sensitive to H₂O₂ than the Δznu mutant strain QT1434 without zinc supplementation. However, supplementation with 10 μ M of Zn²⁺ resulted in a regain in resistance of strain QT1555 to H₂O₂ (Fig. 6b). Supplementation with zinc had no effect on the resistance of the wild-type strain or the H₂O₂-sensitive $\Delta sit\Delta mntH$ control strain, which is defective for transport of manganese. Therefore, supplementation with zinc alone did not have a non-specific effect of increased resistance to H₂O₂. These results indicate that loss of the zinc transporters, in particular Znu, resulted in increased sensitivity to H₂O₂ which could be alleviated by supplementation with zinc.

Zinc transport mutants demonstrate decreased motility.

As genes required for production of flagella and motility are affected by zinc availability (45, 66) and since motility contributes to colonization and persistence in the urinary tract [387], we investigated whether loss of zinc transporters affected motility. No difference in motility was observed for the Δznu or $\Delta zupT$ mutants. However, the $\Delta znu\Delta zupT$ strain QT1555 was less motile than UPEC strain CFT073. The motility of this mutant was partially restored by

supplementation with zinc (Fig. 7), and the *znu* complemented mutant strain QT1932 regained motility to wild-type levels.

Discussion:

In the present study, we determined the roles of the Znu and ZupT zinc transporters for growth and $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake by *E. coli* K-12 and UPEC strain CFT073, and the contribution of these transporters to urinary tract colonization by strain CFT073. Our results indicate that the Znu and ZupT transporters are required for growth in medium where metal availability is limited. Zn^{2+} rescued the growth of the zinc-transporter-deficient *E. coli* strains in minimal medium, while Mn^{2+} and Fe^{2+} failed to do so, indicating that zinc deficiency in the absence of these transporters was a limiting factor for growth (Figs. 1 and 2). Zinc ions are second only to iron in abundance inside *E. coli* cells, whereas manganese levels vary considerably depending on growth phase and conditions [16, 20, 22]. Zinc is the only metal that is present as a cofactor or a structural component in enzymes belonging to six different major functional groups [34]. It has been estimated that an *E. coli* cell contains an average of 200 000 Zn^{2+} ions, corresponding to a cellular zinc concentration of 0.1 mM [32]. These zinc ions are bound to metalloproteins or other ligands, and no free zinc ions are present in the *E. coli* cell [22]. Zn^{2+} homeostasis is tightly regulated by Zur (regulator of uptake systems) and ZntR (regulator of export systems) [21, 148], and these zinc-dependent transcriptional regulators exhibit femtomolar sensitivity to changes in the Zn^{2+} intracellular pool [22].

When expressed from a medium-copy plasmid, either the *znuACB* or *zupT* genes complemented the growth defect of a $\Delta znu\Delta zupT$ *E. coli* K-12 mutant strain, whereas the *sitABCD* transporter only provided a slight gain in growth (Fig. 1). These results suggest that, in

contrast to either ZnuACB or ZupT, the pathogen-specific SitABCD metal transporter which has been shown to transport both Mn and Fe [77] is not an efficient zinc transporter. The ZnuACB transporter was shown to be the predominant Zn transporter in UPEC strain CFT073 in growth and uptake assays, and in a Δznu background cumulative loss of *zupT* or *sitABCD* did not reduce $^{65}\text{Zn}^{2+}$ uptake any further (Fig. 3). Results also demonstrated that the ZupT transporter contributed to Zn-dependent growth, since the cumulative loss of *znu* and *zupT* greatly impeded bacterial growth in metal-deficient medium, and this growth could be restored by supplementation with zinc (Fig. 2). The uptake results in the CFT073 transport mutants correlated well with the growth assays, in which loss of the *znu* cluster affected the growth of UPEC strain CFT073 in minimal medium, whereas loss of either *zupT* or *sitABCD* alone had no effect on growth of strain CFT073.

ZnuACB belongs to the same family of transporters as SitABCD, the C9 cluster of ATP binding cassette (ABC) manganese and zinc permeases [63], whereas ZupT belongs to the ZRT IRT-like proteins (ZIP) family of transporters [187]. While ZnuACB uses energy generated by ATP hydrolysis for transport, ZupT is thought to require a chemo-osmotic gradient for metal transport. ZnuACB functions as a Zn^{2+} -specific transporter, whereas ZupT has also been shown to mediate the uptake of Mn^{2+} and Fe^{2+} [65, 188]. The transport specificity and higher affinity of ZnuACB could explain why loss of ZnuACB had greater impact on the growth of CFT073 than loss of the ZupT transporter. The higher Zn^{2+} affinity of ZnuACB, is probably due to the ZnuA periplasmic ligand binding protein (PLBP), which contains a metal-binding histidine-rich loop protruding from the vicinity of the protein in addition to the high-affinity Zn^{2+} -binding pocket located inside the protein. Another mechanism increasing the affinity of ZnuA towards Zn^{2+} is

the ability of this protein to undergo conformational changes that could facilitate its interactions with the ZnuB₂ homodimer permease. [65, 179]

The ExPEC associated SitABCD transporter was suspected to be a possible zinc-transporter, since SitA is a member of the cluster 9 general transition metal transporters, such as TroA, which has been shown to efficiently bind zinc and other metals such as manganese and iron [30]. As well, uptake of Fe²⁺ and Mn²⁺ by the *Salmonella* Sit and of Fe²⁺ by the orthologous *Yersinia* Yfe transporter was inhibited by Zn²⁺ at μM concentrations [59, 236]. Indeed, when expressed from a medium-copy plasmid, SitABCD partially compensated for growth deficiency and also increased accumulation of ⁶⁵Zn²⁺ in a Δ*znu*Δ*zupT* K-12 strain. However, SitABCD mediated ⁶⁵Zn²⁺ accumulation did not correlate with an increase in growth in minimal media. It is therefore likely that SitA can bind Zn²⁺ in the periplasm resulting in a zinc accumulation, although this binding results in little or no Zn²⁺ uptake into the cytoplasm. Since *sitABCD* only provided a marginal growth increase to the CFT073 Δ*znu*Δ*zupT* strain in growth assays (Fig. 2), and as the CFT073 Δ*znu*Δ*zupT* mutant was no more able to grow on minimal plates than the *E. coli* K-12 Δ*znu*Δ*zupT* mutant, these results suggest that the Sit system is unable to compensate for the transport of Zn²⁺ in the absence of the Znu and ZupT systems. Hence, Znu and ZupT appear to be the only transporters that can provide sufficient Zn²⁺-uptake for growth of either *E. coli* K-12 strain MG1655 or UPEC strain CFT073.

Our results demonstrate the importance of zinc-transporters for UPEC strain CFT073 during urinary tract infection (Figs. 4 and 5). Loss of the Znu transporter attenuated UPEC strain CFT073, and loss of both the Znu and ZupT systems further decreased the capacity to colonize the urinary tract in the murine co-infection challenge and the kidneys in the single-strain infection model. However, loss of ZupT alone had no impact on urinary tract colonization. Moreover,

complementation of the UPEC $\Delta znu\Delta zupT$ mutant with a chromosomal insertion of the *znuACB* genes restored the capacity to infect the bladder and kidneys at levels similar to the wild-type parent. These results indicate that ZnuACB plays a predominant role for Zn transport both in vitro and during *E. coli* urinary tract infection. We have also determined the importance of the Znu and ZupT transporters for avian pathogenic (APEC) strain $\chi 7122$ in a chicken colibacillosis infection model. In a co-infection model, the APEC Δznu strain was attenuated similarly to UPEC Δznu strain, whereas the APEC $\Delta zupT$ was as virulent as its isogenic parent strain (unpublished results). The importance of Znu and zinc transport for extra-intestinal infections is therefore likely to be of general importance for a variety of pathogenic *E. coli* strains and in different host species. This is not surprising given that zinc-transport related virulence phenotypes have also been described for other bacterial pathogens in a number of host species or cellular models. [55 , 57, 197-200]

The UPEC zinc transport mutants grew well in human urine, which is considered to be a relatively zinc replete environment, as urinary zinc losses amount to an average of 9 $\mu\text{M}/\text{day}$ in healthy subjects and vary little when a diet is zinc-balanced [388]. However, despite the apparently adequate availability of zinc in urine in healthy individuals, the zinc availability following infection may be dramatically altered following infection in both extracellular and intracellular host environments [44, 55, 109]. A recent study on zinc-transport related virulence phenotypes of *S. enterica* demonstrated that ZnuACB is expressed in intracellular environments, which strongly suggests that Zn^{2+} availability is limited within such cells. [55] UPEC strains have been shown to form intracellular bacterial communities (IBC) in bladder epithelial cells [389], while intracellular zinc has been shown to be bound to metallothioneins and transported to specific cellular vacuoles for storage [107, 123]. Thus zinc could be limited during IBC

formation. ExPEC also cause septicaemia, and in plasma zinc is mainly bound to albumin and to lesser extent to α_2 -macroglobulin [122]. Zinc also could be bound by other immune induced proteins such as calprotectin released by neutrophils during response to bacterial infection [44, 45]. Thus overall, during UTI as with other extra-intestinal infections, zinc availability may become reduced and bacterial zinc transporters may therefore contribute to increased fitness for colonization of host tissues or cells.

Although decreased zinc availability could potentially result in decreased activity of many bacterial enzymes implicated in cellular metabolism, physiology and growth, we have specifically identified two phenotypes that could contribute to urinary tract virulence that were impaired in the zinc transport mutants and were shown to be compensated by supplementation with zinc: sensitivity to oxidative stress (Fig. 6) and decreased motility (Fig. 7).

The implication of zinc-transporters in oxidative stress resistance is a new finding which will require further investigation. Zinc protects against iron-triggered membrane lipid oxidation [92, 167]. which may partially explain why Znu and ZupT-mediated zinc transport may provide resistance against oxidative stress. One explanation for increased sensitivity to hydrogen peroxide may be due to lowered activity or decreased expression of the *E. coli* SodC, Zn/Cu superoxide dismutase. In *E. coli* SodC has been shown to contribute to increased resistance to H₂O₂ [92, 390], and zinc ions have been shown to be required for stable binding of copper to the SodC catalytic site [391]. In *E. coli* K-12, ZnuA has been shown to directly compete with the Cu/Zn superoxide dismutase SodC for Zn²⁺ ions [175], suggesting expression of ZnuACB could actually lower the efficiency of SodC antioxidant activity. However, in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, Ammendola et al. [391] recently reported that zinc limitation, and the loss of ZnuA resulted in a decreased level of expression of SodCII, which is the *Salmonella* ortholog of *E. coli* SodC. Hence, increased zinc availability through zinc transporters, particularly the Znu

transporter, may provide an important signal for increased SodC expression which may protect against oxidative stress.

Another possible explanation of a role for Zn transport in resistance to oxidative stress is suggested by the fact that the global iron uptake repressor Fur is a zinc-metalloprotein [162, 392]. Fur expression is under control of the global oxidative stress resistance regulators OxyR and SoxS, and Fur is directly implicated in oxidative stress and its inactivation results in increased oxidative damage to the cell through the iron-dependent Fenton chemistry reactions [89, 248]. In addition, in *E. coli* K-12 *znu* genes have been shown to be induced under iron repletion and repressed under iron depletion. [173] Under iron repletion, bacterial cells require the Fur regulator to control iron homeostasis and reduce iron overload and oxidative stress. Therefore, reduced Zn²⁺ uptake may possibly compromise Fur function and lead to increased susceptibility to oxidative stress.

Loss of both the Znu and ZupT transporters was required to reduce the motility of UPEC strain CFT073, and this decrease in motility was shown to be Zn-dependent. FlhC, a sub-unit of the FlhCD transcriptional regulator of flagellar genes is a zinc-metalloprotein [393], and expression of flagellar genes has been shown to decrease under conditions of zinc-restriction [154]. The importance of motility for the competitive fitness and establishment of UTI by UPEC strain CFT073 and particularly colonization of the kidneys has been established previously [387, 394]. In our current study, using both the co-infection and single-strain infection models, colonization of the kidneys was shown to be reduced in the zinc transport deficient strains, which could at least in part be due to a decrease in motility.

Taken together, our overall findings establish that in *E. coli* Znu plays a predominant role in zinc transport and urinary tract colonisation, and that ZupT plays a secondary role. Future

investigations will be important to establish the specific mechanisms by which loss of these transporters compromise ExPEC fitness and physiology during extra-intestinal infections.

Acknowledgements

Funding for the advancement of this project was provided to C. M. D. by the Canadian Institutes of Health Research and the Canada Research Chairs program. M.S. was the recipient of a scholarship from the Fondation Armand-Frappier.

REFERENCES

1. **Althaus, E. W., C. E. Outten, K. E. Olson, H. Cao, and T. V. O'Halloran.** 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry* **38**:6559-69.
2. **Ammendola, S., P. Pasquali, F. Pacello, G. Rotilio, M. Castor, S. J. Libby, N. Figueroa-Bossi, L. Bossi, F. C. Fang, and A. Battistoni.** 2008. Regulatory and structural differences in the Cu,Zn-superoxide dismutases of *Salmonella enterica* and their significance for virulence. *J Biol Chem* **283**:13688-99.
3. **Ammendola, S., P. Pasquali, C. Pistoia, P. Petrucci, P. Petrarca, G. Rotilio, and A. Battistoni.** 2007. High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of *Salmonella enterica*. *Infect Immun* **75**:5867-76.
4. **Anderson, G. G., S. M. Martin, and S. J. Hultgren.** 2004. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. *Microbes Infect* **6**:1094-101.
5. **Andreini, C., L. Banci, I. Bertini, and A. Rosato.** 2006. Zinc through the three domains of life. *J Proteome Res* **5**:3173-8.
6. **Andrews, S. C., A. K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones.** 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-37.
7. **Auld, D. S.** 2001. Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites. *Biometals* **14**:271-313.

8. **Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori.** 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Mol Syst Biol* **2**:2006 0008.
9. **Bearden, S. W., and R. D. Perry.** 1999. The Yfe system of *Yersinia pestis* transports iron and manganese and is required for full virulence of plague. *Mol Microbiol* **32**:403-14.
10. **Berducci, G., A. P. Mazzetti, G. Rotilio, and A. Battistoni.** 2004. Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu,Zn superoxide dismutase. *FEBS Lett* **569**:289-92.
11. **Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao.** 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* **277**:1453-74.
12. **Blencowe, D. K., and A. P. Morby.** 2003. Zn(II) metabolism in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev* **27**:291-311.
13. **Boyer, E., I. Bergevin, D. Malo, P. Gros, and M. F. Cellier.** 2002. Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Infect Immun* **70**:6032-42.
14. **Brzuszkiewicz, E., H. Bruggemann, H. Liesegang, M. Emmerth, T. Olschlager, G. Nagy, K. Albermann, C. Wagner, C. Buchrieser, L. Emody, G. Gottschalk, J. Hacker, and U. Dobrindt.** 2006. How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:12879-84.
15. **Campoy, S., M. Jara, N. Busquets, A. M. Perez De Rozas, I. Badiola, and J. Barbe.** 2002. Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in *Salmonella enterica* serovar typhimurium virulence. *Infect Immun* **70**:4721-5.
16. **Chandra, B. R., M. Yogavel, and A. Sharma.** 2007. Structural analysis of ABC-family periplasmic zinc binding protein provides new insights into mechanism of ligand uptake and release. *J Mol Biol* **367**:970-82.

17. **Chang, A. C., and S. N. Cohen.** 1978. Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid. *J Bacteriol* **134**:1141-56.
18. **Chen, S. L., C. S. Hung, J. Xu, C. S. Reigstad, V. Magrini, A. Sabo, D. Blasiar, T. Bieri, R. R. Meyer, P. Ozersky, J. R. Armstrong, R. S. Fulton, J. P. Latreille, J. Spieth, T. M. Hooton, E. R. Mardis, S. J. Hultgren, and J. I. Gordon.** 2006. Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: a comparative genomics approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5977-82.
19. **Claverys, J. P.** 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res Microbiol* **152**:231-43.
20. **Corbin, B. D., E. H. Seeley, A. Raab, J. Feldmann, M. R. Miller, V. J. Torres, K. L. Anderson, B. M. Dattilo, P. M. Dunman, R. Gerads, R. M. Caprioli, W. Nacken, W. J. Chazin, and E. P. Skaar.** 2008. Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses. *Science* **319**:962-5.
21. **Cousins, R. J., J. P. Liuzzi, and L. A. Lichten.** 2006. Mammalian zinc transport, trafficking, and signals. *J Biol Chem* **281**:24085-9.
22. **D'Autreaux, B., L. Pecqueur, A. Gonzalez de Peredo, R. E. Diederix, C. Caux-Thang, L. Tabet, B. Bersch, E. Forest, and I. Michaud-Soret.** 2007. Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry* **46**:1329-42.
23. **Datsenko, K. A., and B. L. Wanner.** 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:6640-5.
24. **Desrosiers, D. C., Y. C. Sun, A. A. Zaidi, C. H. Eggers, D. L. Cox, and J. D. Radolf.** 2007. The general transition metal (Tro) and Zn²⁺ (Znu) transporters in *Treponema pallidum*: analysis of metal specificities and expression profiles. *Mol Microbiol* **65**:137-52.
25. **Dobrindt, U.** 2005. (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**:357-71.

26. **Dozois, C. M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd.** 2003. Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:247-52.
27. **Eide, D. J.** 2006. Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc. *Biochim Biophys Acta* **1763**:711-22.
28. **Finney, L. A., and T. V. O'Halloran.** 2003. Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors. *Science* **300**:931-936.
29. **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, and K. D. Smith.** 2006. The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:16502-7.
30. **Folin, M., E. Contiero, and G. M. Vaselli.** 1994. Zinc content of normal human serum and its correlation with some hematic parameters. *Biometals* **7**:75-9.
31. **Garrido, M. E., M. Bosch, R. Medina, M. Llagostera, A. M. Perez de Rozas, I. Badiola, and J. Barbe.** 2003. The high-affinity zinc-uptake system ZnuACB is under control of the iron-uptake regulator (*fur*) gene in the animal pathogen *Pasteurella multocida*. *FEMS Microbiol Lett* **221**:31-7.
32. **Gort, A. S., D. M. Ferber, and J. A. Imlay.** 1999. The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **32**:179-91.
33. **Grass, G., S. Franke, N. Taudte, D. H. Nies, L. M. Kucharski, M. E. Maguire, and C. Rensing.** 2005. The metal permease ZupT from *Escherichia coli* is a transporter with a broad substrate spectrum. *J Bacteriol* **187**:1604-11.
34. **Grass, G., M. D. Wong, B. P. Rosen, R. L. Smith, and C. Rensing.** 2002. ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **184**:864-6.
35. **Hancock, V., L. Ferrieres, and 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**:167-75.
36. **Hantke, K.** 2005. Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol* **8**:196-202.
37. **Hentze, M. W., M. U. Muckenthaler, and N. C. Andrews.** 2004. Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism. *Cell* **117**:285-97.

38. **Johnson, J. R., and T. A. Russo.** 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: "the other bad E coli". *J Lab Clin Med* **139**:155-62.
39. **Johnson, T. J., S. Kariyawasam, Y. Wannemuehler, P. Mangiamele, S. J. Johnson, C. Doetkott, J. A. Skyberg, A. M. Lynne, J. R. Johnson, and L. K. Nolan.** 2007. The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *J Bacteriol* **189**:3228-36.
40. **Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**:123-40.
41. **Kehres, D. G., A. Janakiraman, J. M. Schlauch, and M. E. Maguire.** 2002. SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol* **184**:3159-66.
42. **Kehres, D. G., and M. E. Maguire.** 2003. Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **27**:263-90.
43. **Kim, S., K. Watanabe, T. Shirahata, and M. Watarai.** 2004. Zinc uptake system (*znuA* locus) of *Brucella abortus* is essential for intracellular survival and virulence in mice. *J Vet Med Sci* **66**:1059-63.
44. **Kim, Y. H., Y. Lee, S. Kim, J. Yeom, S. Yeom, B. Seok Kim, S. Oh, S. Park, C. O. Jeon, and W. Park.** 2006. The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in the formation of biofilms. *Proteomics* **6**:6181-93.
45. **King, J. C., D. M. Shames, and L. R. Woodhouse.** 2000. Zinc Homeostasis in Humans. *J. Nutr.* **130**:1360S-1366.
46. **Lane, M. C., V. Lockett, G. Monterosso, D. Lamphier, J. Weinert, J. R. Hebel, D. E. Johnson, and H. L. Mobley.** 2005. Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun* **73**:7644-56.
47. **Leveille, S., M. Caza, J. R. Johnson, C. Clabots, M. Sabri, and C. M. Dozois.** 2006. Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catechol siderophore receptor. *Infect Immun* **74**:3427-36.

48. **Lewis, D. A., J. Klesney-Tait, S. R. Lumbley, C. K. Ward, J. L. Latimer, C. A. Ison, and E. J. Hansen.** 1999. Identification of the *znuA*-encoded periplasmic zinc transport protein of *Haemophilus ducreyi*. *Infect Immun* **67**:5060-8.
49. **Linton, K. J.** 2007. Structure and Function of ABC Transporters. *Physiology* **22**:122-130.
50. **Liuzzi, J. P., and R. J. Cousins.** 2004. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr* **24**:151-72.
51. **Liuzzi, J. P., L. A. Lichten, S. Rivera, R. K. Blanchard, T. B. Aydemir, M. D. Knutson, T. Ganz, and R. J. Cousins.** 2005. Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:6843-8.
52. **Lusitani, D., S. E. Malawista, and R. R. Montgomery.** 2003. Calprotectin, an abundant cytosolic protein from human polymorphonuclear leukocytes, inhibits the growth of *Borrelia burgdorferi*. *Infect Immun* **71**:4711-6.
53. **Lymberopoulos, M. H., S. Houle, F. Daigle, S. Leveille, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, J. R. Johnson, and C. M. Dozois.** 2006. Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic *Escherichia coli* O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract. *J Bacteriol* **188**:6449-59.
54. **Marrs, C. F., L. Zhang, and B. Foxman.** 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Lett* **252**:183-90.
55. **Miller, V. L., and J. J. Mekalanos.** 1988. A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in *Vibrio cholerae* requires *toxR*. *J Bacteriol* **170**:2575-83.
56. **Mobley, H. L., D. M. Green, A. L. Trifillis, D. E. Johnson, G. R. Chippendale, C. V. Lockett, B. D. Jones, and J. W. Warren.** 1990. Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infect Immun* **58**:1281-9.
57. **Nelson, N.** 1999. Metal ion transporters and homeostasis. *EMBO J* **18**:4361-71.
58. **Outten, C. E., and T. V. O'Halloran.** 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science* **292**:2488-92.

59. **Patzer, S. I., and K. Hantke.** 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **28**:1199-210.
60. **Rink, L., and H. Haase.** 2007. Zinc homeostasis and immunity. *Trends Immunol* **28**:1-4.
61. **Russo, T. A., U. B. Carlino, and J. R. Johnson.** 2001. Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ircA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **69**:6209-16.
62. **Sabri, M., M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Bree, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss, 3rd, and C. M. Dozois.** 2008. Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain χ 7122. *Infect Immun* **76**:601-11.
63. **Sabri, M., S. Leveille, and 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**:745-58.
64. **Schaible, U. E., and S. H. Kaufmann.** 2005. A nutritive view on the host-pathogen interplay. *Trends Microbiol* **13**:373-80.
65. **Schaible, U. E., and S. H. Kaufmann.** 2004. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol* **2**:946-53.
66. **Sekler, I., S. L. Sensi, M. Hershinkel, and W. F. Silverman.** 2007. Mechanism and regulation of cellular zinc transport. *Mol Med* **13**:337-43.
67. **Sigdel, T. K., J. A. Easton, and M. W. Crowder.** 2006. Transcriptional response of *Escherichia coli* to TPEN. *J Bacteriol* **188**:6709-13.
68. **Sohnle, P. G., M. J. Hunter, B. Hahn, and W. J. Chazin.** 2000. Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14). *J Infect Dis* **182**:1272-5.
69. **Storz, G., and J. A. Imlay.** 1999. Oxidative stress. *Curr Opin Microbiol* **2**:188-94.
70. **Torres, A. G., P. Redford, R. A. Welch, and S. M. Payne.** 2001. TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infect Immun* **69**:6179-85.
71. **Touati, D., M. Jacques, B. Tardat, L. Bouchard, and S. Despied.** 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in Δfur mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J Bacteriol* **177**:2305-14.

72. **Wally, J., and S. K. Buchanan.** 2007. A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin. *Biometals* **20**:249-62.
73. **Wang, S., R. T. Fleming, E. M. Westbrook, P. Matsumura, and D. B. McKay.** 2006. Structure of the *Escherichia coli* FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription. *J Mol Biol* **355**:798-808.
74. **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, and F. R. Blattner.** 2002. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:17020-4.
75. **Wright, K. J., P. C. Seed, and S. J. Hultgren.** 2005. Uropathogenic *Escherichia coli* flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect Immun* **73**:7657-68.
76. **Yang, X., T. Becker, N. Walters, and D. W. Pascual.** 2006. Deletion of *znuA* virulence factor attenuates *Brucella abortus* and confers protection against wild-type challenge. *Infect Immun* **74**:3874-9.
77. **Yatsunyk, L. A., J. A. Easton, L. R. Kim, S. A. Sugarbaker, B. Bennett, R. M. Breece, Vorontsov, II, D. L. Tierney, M. W. Crowder, and A. C. Rosenzweig.** 2008. Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem* **13**:271-88.
78. **Zago, M. P., and P. I. Oteiza.** 2001. The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants. *Free Radic Biol Med* **31**:266-74.

TABLE 1. Bacterial strains and plasmids used in this study.

<i>Strains</i>	<i>Characteristic(s)^a</i>	<i>Reference or source</i>
<i>E. coli</i> K-12 :		
DH5 α	F- λ - 80 (<i>lacZYA-argF</i>) <i>endA1 recA1 hsdR17 deoR thi-1 supE44 gyrA96 relA1</i> , Nal ^R	Bethesda Laboratories
BW25113	F-, λ - (<i>lacIq rrnBT14 lacZWJ16 hsdR514 araBADAIH33 rhaBADLD78</i>)	[315]
JWK5831_1	BW25113 Δ <i>znuA::kan</i> , Km ^R	[351]
MG1655	F- λ - <i>ilvG rfb-50 rph-1</i>	[395]
QT1369	MG1655 Δ <i>znu::kan</i> . Km ^R	This study
QT1370	MG1655 Δ <i>znu::FRT</i>	This study
QT1435	MG1655 Δ <i>znu::FRT</i> Δ <i>zupT::kan</i> . Km ^R	This study
QT1460	QT1435 (pACYC184), Km ^R . Cm ^R , Tc ^R	This study
QT1461	QT1435 (pIJ28-pACYC184:: <i>sitABCD</i>). Km ^R , Cm ^R	This study
QT1462	QT1435 (pIJ156-pACYC184:: <i>znuACB</i>). Km ^R , Cm ^R	This study
QT1463	QT1435 (pIJ202 -pACYC184:: <i>zupT</i>). Km ^R , Cm ^R	This study
ExPEC		
CFT073	UPEC wild type pyelonephritis strain	[71, 330]
QT908	CFT073 Δ <i>sit::tetAR</i> . Tc ^R	This study
QT1081	CFT073 Δ <i>lacZYA</i>	This study
QT1239	APEC χ 7122 Δ <i>sit::tetAR</i> Δ <i>mntH::kan</i> . Km ^R , Tc ^R	[77]
QT1377	CFT073 Δ <i>znu::kan</i> . Km ^R	This study
QT1378	CFT073 Δ <i>sit::tetAR</i> Δ <i>znu::kan</i> . Km ^R , Tc ^R	This study
QT1434	CFT073 Δ <i>znu::FRT</i>	This study
QT1554	CFT073 Δ <i>zupT::kan</i> . Km ^R	This study
QT1555	CFT073 Δ <i>znu::FRT</i> Δ <i>zupT::kan</i> . Km ^R	This study
QT1634	CFT073 Δ <i>znu::FRT</i> Δ <i>zupT::kan</i> Δ <i>sit::tetAR</i> Km ^R , Tc ^R	This study
QT1640	CFT073 Δ <i>znu::FRT</i> Δ <i>sit::tetAR</i> . Tc ^R	This study
QT1932	QT1555 ::pIJ254 (pGP704:: <i>znuACB</i>). Km ^R , Ap ^R	This study
Plasmids		
pACYC184	p15A replicon cloning vector; Cm ^R Tc ^R	[334]
pCP20	FLP helper plasmid Ts replicon, Ap ^R Cm ^R	[315]
pGP704	<i>oriR6K mobRP4</i> , Ap ^R	[396]
pIJ28	<i>sitABCD</i> region of χ 7122 cloned into <i>HindIII</i> site of pACYC184 plasmid vector Cm ^R	[77]
pIJ156	<i>znuACB</i> region of MG1655 cloned into <i>HindIII</i> site of pACYC184 plasmid vector Cm ^R	This study
pIJ202	<i>zupT</i> operon of MG1655 cloned into <i>HindIII</i> site of pACYC184 plasmid vector Cm ^R	This study
pIJ254	<i>znuACB</i> region cloned from pIJ156 into <i>XbaI</i> and <i>EcoRV</i> sites of pGP704	This study
pKD13	Template plasmid for the amplification of the <i>kan</i> cassette bordered by <i>FRT</i> sites	[315]
pKD46	λ -red recombinase plasmid Ts replicon Ap ^R	[315]

^a- Ap: ampicillin, Cm: chloramphenicol, Km: kanamycin, Nal: nalidixic acid, Tc: tetracycline.

TABLE 2 : Primers used in this study

<i>Primers</i>	<i>Characteristic(s)</i>	<i>Sequence</i>	<i>T_m °C</i>
CMD23	SitA-SitD region amplification (used with CMD42)	CGCAGGGGGCACAACCTGAT	54
CMD42		CTGTGCGCTGCTGTCGGTC	54
CMD264	Amplification of <i>znu::kan</i> from JWK5831_1 (used with CMD265)	AAAACGCCACAATCCAGTTC	54
CMD265		CGGCAGTACGGTCATAGGTT	56
CMD637	Contains a <i>Hind</i> III restriction site; amplification of <i>znuACB</i> region of MG1655 for cloning (used with CMD638)	GACAAGCTTGGCCAGAGTAAGAACGG	56
CMD638	Contains a <i>Hind</i> III restriction site	CGAAAGCTTCGTGGAATCACTTTGGC	56
CMD715	Construction of <i>zupT::kan</i> using pKD13 template plasmid (used with CMD716)	TTCCCGCCGTTTGTAGCAGCACTAAACTGAA TCCCATCACTGACATTCCAATTCCGGGGATCC GTCGACC	68
CMD716		CTCTCATTCTGACCATACTGGCGGGGGCAGC CACGTTTATTGGCGCGTTTTGTAGGCTGGAGC TGCTTCG	68
CMD717	Contains a <i>Hind</i> III restriction site; amplification of <i>zupT</i> operon of MG1655 for cloning (used with CMD718)	GTTAAGCTTACGATCTGCCTGAAGGTGAA	54
CMD718	Contains a <i>Hind</i> III restriction site	GAAGAAGCTTATGCGCTGGACAACCTTCTG	54

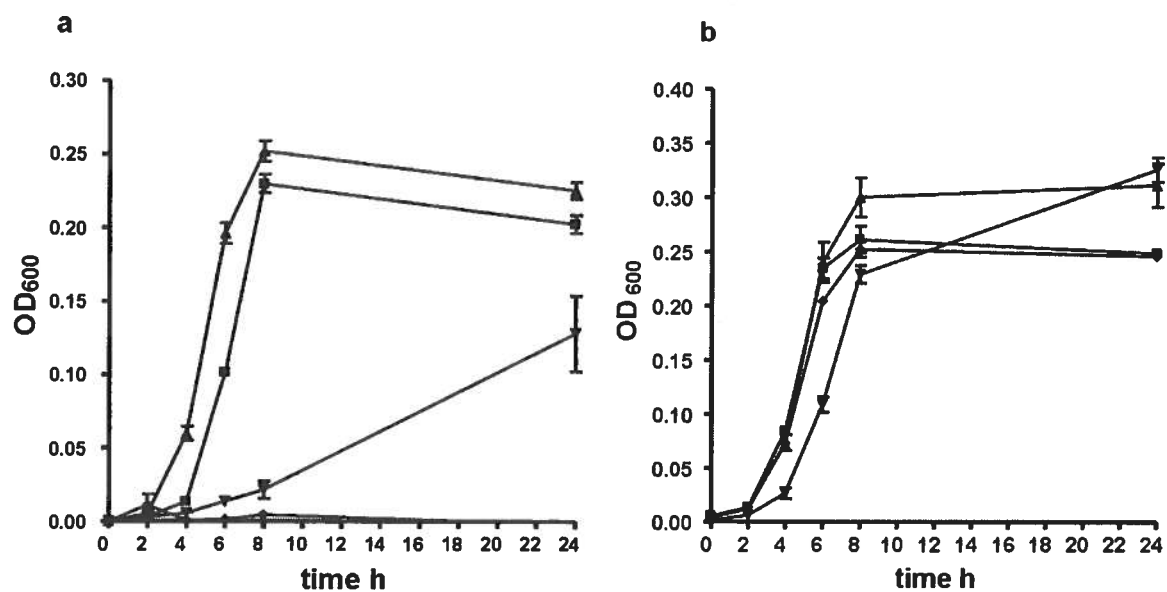


Fig. 1. Growth of the *E. coli* K-12 $\Delta znu\Delta zupT$ mutant QT1435 containing plasmid encoded metal transporters in dilute tryptone (DT)-EGTA medium (a) or DT-EGTA with $5\mu\text{M Zn}^{2+}$ (b). Symbols represent: ♦ QT1435 (pACYC184- vector control); QT1435 ▲ (pIJ202-*zupT*); ■ QT1435 (pIJ156-*znuACB*); ▼ QT1435 (pIJ28-*sitABCD*).

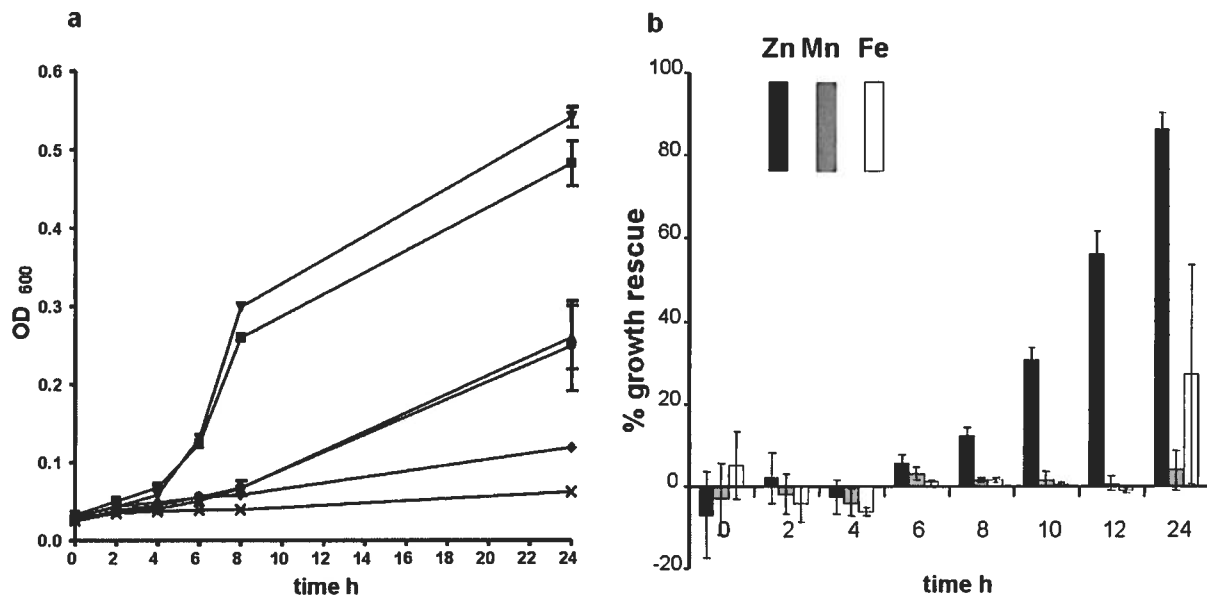


Fig. 2. (a) Growth of uropathogenic *E. coli* strain CFT073 and metal transport defective mutant derivatives in M9-glucose medium. Symbols represent: ■ CFT073 wild-type; ▲ Δznu (QT1434); ▼ $\Delta zupT$ (QT1554); ◆ $\Delta znu\Delta zupT$ (QT1555); ● $\Delta znu\Delta sitABCD$ (QT1640); × $\Delta znu\Delta zupT\Delta sitABCD$ (QT1634). **(b)** Growth rescue of UPEC $\Delta znu\Delta zupT$ strain QT1555 in M9-glucose medium supplemented with 5 μM of Zn^{2+} (black bars), Mn^{2+} (light grey bars) or Fe^{3+} (white bars). Growth of the strain is presented as the % growth compared to the wild-type strain CFT073 strain based on the formula:

$$\frac{[(\text{OD}_{600} \text{ mutant in metal enriched medium}) - (\text{OD}_{600} \text{ of the mutant})]}{(\text{OD}_{600} \text{ of the wild-type strain})} \times 100.$$

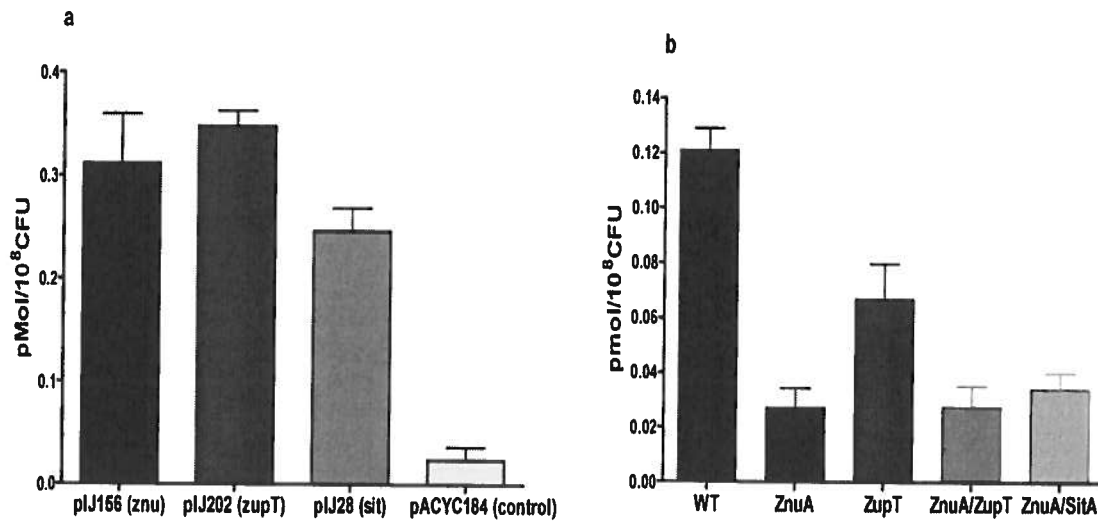


Fig. 3. Uptake of $^{65}\text{Zn}^{2+}$ by (a) *E. coli* K-12 $\Delta\text{znu}\Delta\text{zupT}$ mutant QT1435 containing plasmid encoded metal transporters or the control vector or (b) uropathogenic *E. coli* strain CFT073 and mutant derivatives WT=wild-type CFT073; ZnuA= Δznu strain QT1434; ZupT= ΔzupT strain QT1554; ZnuA/ZupT = $\Delta\text{znu}\Delta\text{zupT}$ strain QT1555; ZnuA/SitA= $\Delta\text{znu}\Delta\text{sitABCD}$ strain QT1640.

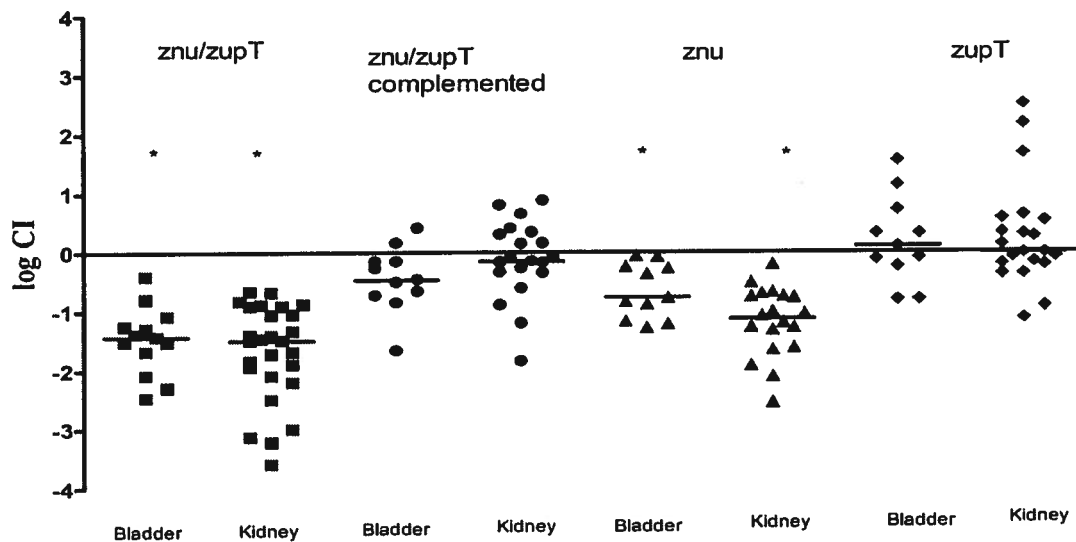


Fig. 4. Comparative colonization of the bladders and kidneys of CBA/J mice co-infected with uropathogenic *E. coli* CFT073 derivatives defective in zinc transporter systems and virulent CFT073 Δlac derivative strain QT1081. A competitive co-infection model was used in which a mixture of QT1081 and different metal transporter mutants were inoculated simultaneously. 48 hours post-infection, tissues were sampled and results are presented as the \log_{10} competitive index (CI). The CI represents the ratio of numbers of the two test strains (mutant / Δlac virulent strain QT51) from the tissues sampled (the output ratio) normalized for the initial numbers of each strain in the inoculum (input). Negative CI values indicate a decreased capacity for the mutant to compete with the virulent test strain QT1081. Horizontal bars indicate the median \log_{10} CI values. Each data point represents a sample from an individual mouse. Both kidneys were sampled separately. Strains tested were; strain QT1434 (Δznu), strain QT1554 ($\Delta zupT$), strain QT1555 ($\Delta znu\Delta zupT$), and the QT1555 (*znuACB* complemented) strain QT1932. Horizontal bars represent the median value for each group. Statistically significant decreases in CI values are indicated with asterisks (* $P < 0.001$) as determined by the Wilcoxon matched pairs test.

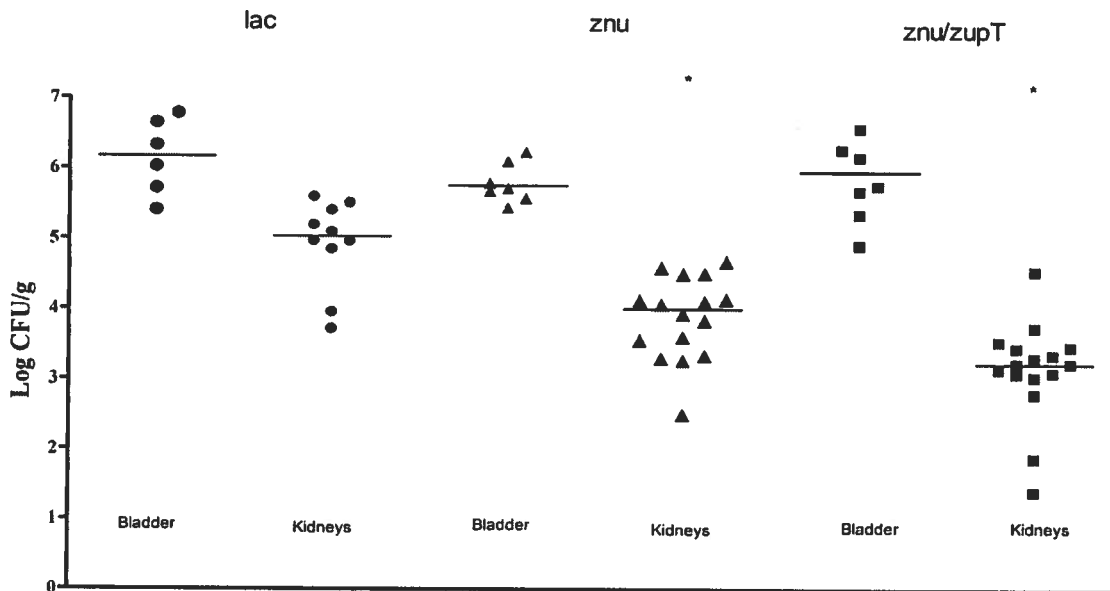


Fig. 5. Colonization of the bladders and kidneys of CBA/J mice infected with virulent uropathogenic *E. coli* CFT073 derivative strain QT1081 (Δlac) and transport mutant CFT073 derivatives in the single-strain infection model. Data are presented as the log CFU/gram of tissue. Each data point represents a tissue sample from an individual infected mouse 48 hours post-infection. Both kidneys were sampled separately. Strains tested were the CFT073 $\Delta lacZYA$ strain QT1081 (*lac*); Δznu strain QT1434 (*znu*), and $\Delta znu\Delta zupT$ strain QT1555 (*znu/zupT*). Horizontal bars represent the median values of each group. Samples that were significantly decreased compared to the virulent Δlac strain are indicated with asterisks (* $P < 0.005$). P values of comparative differences were determined by the Mann-Whitney test.

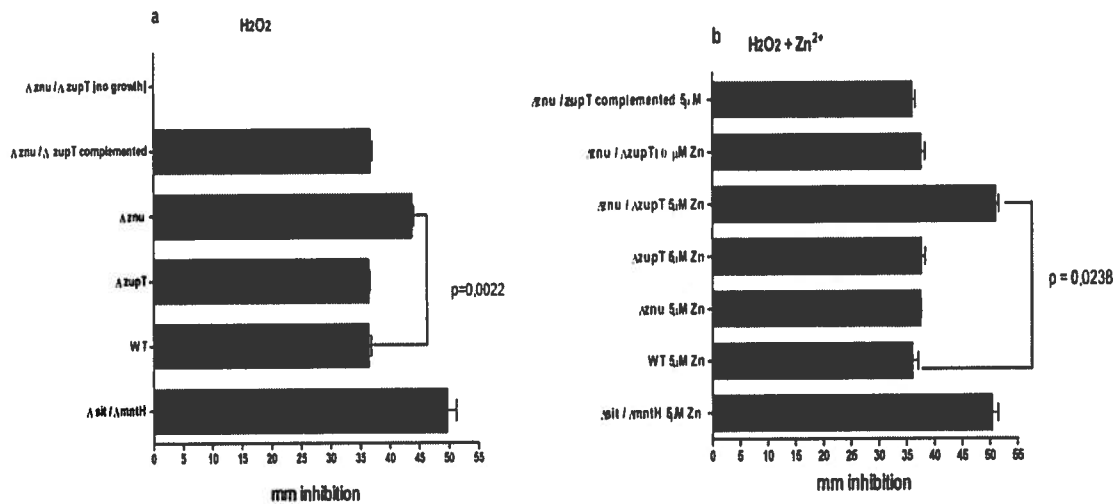


Fig. 6. Sensitivity to H₂O₂. Uropathogenic *E. coli* strain CFT073 and derivatives were seeded onto M9-glucose agar plates without zinc supplementation (a) or with zinc supplementation (b) and subjected to H₂O₂ placed on sterile filter disks. Differences in resistance were assessed from the diameter of the inhibition zone of a culture following overnight growth. Samples were done in triplicate and bars represent the means ± S. D. Strains used were wild-type CFT073 (WT), strain QT1434 (Δznu), strain QT1554 ($\Delta zupT$), strain QT1555 ($\Delta znu\Delta zupT$) and the QT1555 (*znuACB* complemented) strain. Avian pathogenic *E. coli* strain QT1239 ($\Delta sitABCD\Delta mntH$) which is sensitive to H₂O₂ was used as an internal control. Significant differences between the WT parent and isogenic zinc transporter mutants are indicated with p values to the right of the figures.

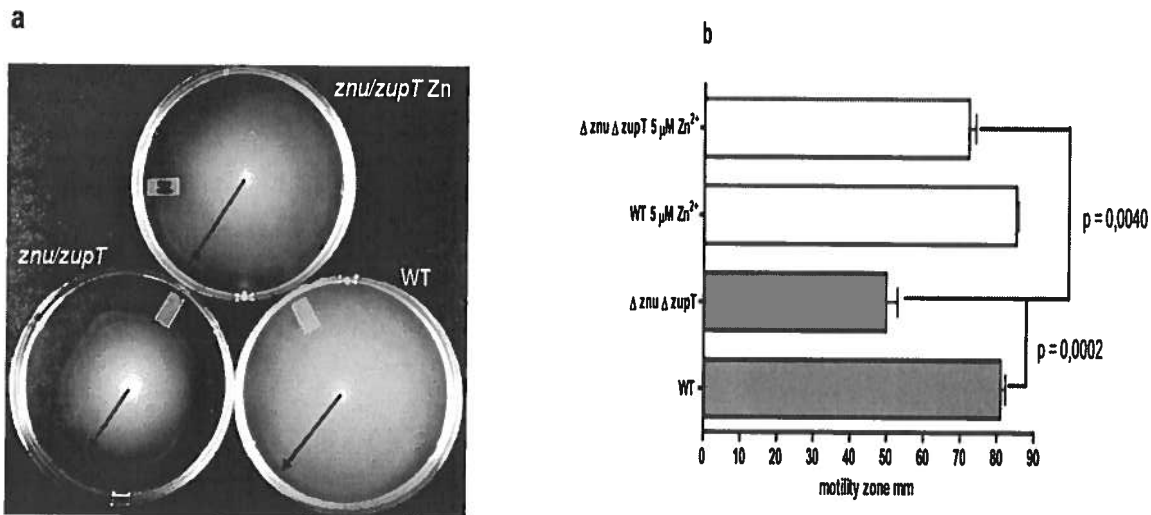


Fig. 7. Loss of zinc transporters affects the swimming motility. Uropathogenic strain CFT073 and derivatives were tested following 18 h growth at 37°C on tryptone motility agar plates (44). (a) Image showing motility distances of the $\Delta znu \Delta zupT$ strain QT1555 (*znu/zupT*) with or without 5 μM Zn^{2+} supplementation compared to the CFT073 wild-type strain (WT). (b) Bar graph indicating distances of motility zones. Statistically different motility between the WT parent and isogenic QT1555 ($\Delta znu \Delta zupT$) strain or QT1555 with or without Zn^{2+} are indicated with p values to the right of the figure. The other mutants: strain QT1434 (Δznu), strain QT1554 ($\Delta zupT$), and the QT1555 (*znuACB* complemented) strain QT1932 were as motile as the WT parent with or without zinc supplementation (not shown).

IX Discussion

Lors de notre étude, portant sur l'implication des transporteurs des cations divalents du fer, manganèse et zinc dans la virulence des souches ExPEC, nous avons abordé l'importance de ces transporteurs pour la croissance des souches d'*E. coli*, les caractéristiques des transporteurs des différents métaux, l'influence de ces transporteurs sur la résistance au stress oxydatif, sur la motilité et sur la virulence. Nous allons à présent discuter les résultats des trois articles, qui représentent le compte rendu du travail ayant mené à l'élaboration de notre thèse et les mettre en relation avec les éléments décrits dans la revue de littérature. Nous soulignerons les résultats qui nous semblent les plus importants, nous tenterons d'en proposer l'explication et finalement nous en ferons la synthèse et nous présenterons les perspectives qui en découlent.

IX a Croissance d'*E. coli* et transporteurs du Fe^{2+} , Mn^{2+} et Zn^{2+} :

La croissance d'une population de cellules bactériennes ne peut se faire en absence de tous les éléments nécessaires à la fabrication des cellules nouvelles à partir des cellules parentales. Les éléments nutritifs qui sont en plus faible quantité dans l'environnement deviennent les facteurs limitants de la croissance. Nous avons décrit dans la revue de la littérature l'importance des ions métalliques en tant que cofacteurs des métallo-enzymes et éléments de structure des métalloprotéines. Nous avons mentionné que l'ensemble de ces ions métalliques (métallome) est un constituant très important de la physiologie cellulaire qui intervient dans les différents aspects du métabolisme. Dans les milieux pauvres en ions métalliques, les bactéries sont dans l'obligation d'exploiter au mieux les réserves restreintes en métaux afin de garder actif leur métabolisme, de préserver leur homéostasie et leur intégrité. En effet, les ions métalliques sont indispensables lors de la respiration, du métabolisme des sucres, acides aminés et lipides, ainsi que lors de la synthèse des acides nucléiques. Donc les ions métalliques sont indispensables pour la croissance des populations bactériennes. (Voir les sections Ia, IIIb, IIIg, IVb, IVh, Vb, et Vg de la revue de la littérature.) Des transporteurs efficaces sont indispensables pour acquérir ces ions métalliques et la perte de la fonction d'un ou plusieurs de ces transporteurs, peut avoir des effets adverses sur la capacité des cellules bactériennes à survivre dans le milieu interne des organismes qui leur servent d'hôtes lors des infections. (Voir les sections IIIi, IVi, Vh de la revue de la littérature.) Il est donc évident que la perte de la fonction des transporteurs du zinc, manganèse et fer, peut provoquer un ralentissement de la croissance des souches ExPEC *in vitro* et il est vraisemblable qu'il en soit de même *in vivo*.

Nous avons pu vérifier expérimentalement que la perte conjointe des deux transporteurs de zinc ZnuACB et ZupT, rendait la souche mutante QT1435 (dérivée de la souche MG1655 d'*E. coli* K-12) incapable de croître dans un milieu minimal appauvri en ions métalliques. Ce défaut de croissance était complété par l'expression de ZnuACB ou de ZupT à partir d'un plasmide. Ce défaut de croissance était de plus levé par l'ajout de 5 μ M de ZnCl₂. (Voir figure 1 de l'article 3.) Parmi les souches mutantes dérivées de la souche UPEC CFT073, la souche ayant perdu le fonctionnement de ZnuACB présentait un fort retard de croissance, alors que la souche ayant perdu ZupT seulement poussait aussi bien que la souche parentale de type sauvage. Par contre, la souche ayant perdu ZnuACB et ZupT ne pouvait plus croître en milieu appauvri en métaux, ce défaut étant complété par l'ajout du zinc et non du fer et du manganèse. (Voir figure 2 de l'article 3.) Ces résultats démontrent que malgré leur capacité conjointe de compléter le défaut de croissance du mutant $\Delta znuACB/\Delta zupT$ d'*E. coli* K-12, Znu et ZupT ne sont pas des transporteurs interchangeables. En fait, ZupT est un transporteur de zinc moins efficace que ZnuACB. En effet, alors que la présence de ZnuACB rendait l'absence de ZupT imperceptible chez les souches mutantes, ZupT n'était que partiellement capable de remplacer ZnuACB dans la souche mutante dérivée de la souche UPEC CFT073.

Ces résultats indiquent que les transporteurs ayant le même substrat cible (dans ce cas le zinc) ne sont pas équivalents du point de vue de leur contribution à la croissance bactérienne et que certains transporteurs sont clairement plus efficaces. Dans ce cas précis, le transporteur ZnuACB qui appartient à la famille des transporteurs ABC, contribue plus à la croissance de la souche UPEC CFT073 en milieu minimal que le transporteur ZupT qui appartient à la famille Zip. La différence de la contribution des deux transporteurs est visible quand ils sont exprimés à partir du chromosome. Par contre, quand ils sont exprimés à partir d'un plasmide cette différence disparaît, probablement en raison du nombre de copies plus important des opérons *znuACB* et *zupT*. Ce plus grand nombre de copies peut permettre une expression plus importante des transporteurs, menant ainsi à une saturation de la cellule bactérienne en zinc et effaçant ainsi la perception des différences d'efficacité entre ZnuACB et ZupT.

Le transporteur SitABCD était incapable de compléter le défaut de croissance des souches ayant perdu la capacité d'utiliser leurs transporteurs de zinc, bien qu'il ait été classé dans le même groupe de transporteurs que ZnuACB par analyse bioinformatique (groupe C9 des transporteurs ABC des métaux de transition). (Voir figures 1 et 2 de l'article 3) SitABCD n'est

donc pas capable de transporter le zinc avec une efficacité suffisante pour soutenir la croissance bactérienne, alors que ZnuACB apparaît comme étant apte à fournir le zinc nécessaire à la croissance. Par contre, SitABCD a été capable de compléter le défaut de croissance de la souche mutante 1017 d'*E. coli* K-12 qui a perdu la capacité de synthétiser les sidérophores et donc de transporter le fer dans un milieu aérobie. (Voir figure 3 de l'article 1.) Le regain de croissance était comparable à celui obtenu en utilisant le sidérophore aérobactine. Ce regain de croissance a été dépendant spécifiquement du fer, puisque ni le manganèse, ni le zinc n'ont pu rétablir la croissance. (Voir figure 4 de l'article 1.) Le transport du zinc par SitABCD était particulièrement inapproprié pour compléter le défaut de croissance de la souche 1017, probablement car la présence du zinc empêchait SitABCD d'importer le fer disponible dans le milieu. En effet, nous avons démontré la capacité de SitABCD à lier l'isotope radioactif de zinc, tout en constatant l'incapacité de SitABCD à contribuer efficacement à la croissance des souches mutantes déficientes dans le transport de zinc. (Voir article 3.) Il est donc plausible qu'en présence de zinc, SitABCD captera les ions de ce métal, ce qui aura pour conséquence une compétition entre le zinc et les autres métaux transportés par SitABCD. Il est donc plausible que la présence de zinc dans le milieu aura une incidence négative sur la capacité de SitABCD à transporter le fer ou le manganèse. Le transport de manganèse permettait un regain partiel de la croissance, probablement du à la capacité du manganèse à remplacer le fer dans certaines métalloprotéines. (Voir figure 4 de l'article 1.)

L'ensemble des résultats portant sur la contribution de SitABCD à la croissance définissent SitABCD en tant que transporteur permettant l'acquisition du fer et du manganèse, mais incapable d'acquérir le zinc, qu'il est néanmoins capable de capter. Par conséquent, l'appartenance d'un transporteur à une famille donnée ne détermine pas sa spécificité de substrat, des caractéristiques de la structure protéique pouvant probablement définir les affinités des transporteurs envers un substrat ionique donné. Nous avons décrit dans la revue de la littérature, la structure protéique des deux transporteurs Sit et Znu, avec leurs traits communs et leurs différences. (Voir sections IIIk, IVm et Vj de la revue de la littérature.)

Nous avons aussi mentionné l'étude menée chez *T. pallidum* qui suggère fortement que ces différences de structure influencent l'activité des homologues de SitABCD (TroABCD) et ZnuACB en différenciant leurs substrats types. [30] Ces différences de structure sont la présence d'une boucle riche en histidines et des changements conformationnels dans la PLBP ZnuA et la

différence entre l'homodimère de la perméase ZnuB₂ et l'hétérodimère SitCD. Ces différences rendent ZnuA nettement plus sélective pour le Zn²⁺, au détriment du Mn²⁺. (Voir section IIIk de la revue de la littérature.) Par contre, l'affinité de SitABCD pour le Zn²⁺ semble assez élevée, mais l'affinité élevée n'est pas une garantie d'un transport efficace. (Sections IVm et Vj.)

Par ailleurs, la souche 1017 possède les transporteurs ZnuACB et ZupT, mais ces derniers ne permettent pas d'acquérir le fer qui est nécessaire à la croissance de cette souche, bien que ZupT ait été capable de transporter du fer *in vitro*. [397] Il apparaît donc probable que les spécificités des différents transporteurs des ions métalliques que possède *E. coli* sont complémentaires, l'ensemble de ces transporteurs couvrant tout le spectre des ions métalliques nécessaires à la physiologie cellulaire bactérienne et étant capable de les acquérir dans divers milieux et niches anatomiques de l'hôte. La redondance apparente des fonctions de transport encodées par le génome d'*E. coli* serait donc nécessaire pour permettre l'approvisionnement en métaux dans les différents milieux dans lesquels vivent les souches d'*E. coli*. Et certaines niches anatomiques du milieu interne de l'organisme hôte sont les milieux dans lesquelles les souches ExPEC devront utiliser les divers transporteurs de métaux qu'elles encodent. (Sections IIIe, IIIf, IVf, IVg, Ve et Vf de la revue de la littérature)

Il est à noter que toutes les souches utilisées dans notre étude étaient capables de croître dans le milieu riche (LB) aussi bien que les souches de type sauvage et les souches dérivées UPEC étaient capables de croître dans l'urine humaine. (Figure 2 de l'article 3.)

IX b Les caractéristiques des transporteurs étudiés :

Afin de définir pourquoi un transporteur est important *in vivo*, nous devons considérer ses caractéristiques. Pour faciliter l'analyse, ces caractéristiques peuvent être subdivisées en caractéristiques de structure et caractéristiques de fonction, évidemment une telle subdivision est quelque peu artificielle puisque la structure et la fonction des transporteurs sont intimement liées. Parmi les caractéristiques de structure on peut nommer l'architecture moléculaire d'un transporteur, l'existence de ses différentes composantes protéiques et les interactions entre ces composantes. Parmi les caractéristiques de fonction on considérera l'affinité pour le substrat et la vitesse du transport, qui ensemble définissent l'efficacité d'un transporteur. Les caractéristiques de fonction et de structure définissent le mécanisme utilisé par un transporteur dans l'acquisition

du substrat, ce mécanisme de transport dépend aussi de la nature de l'énergie utilisée pour le transport.

Les transporteurs ciblés par notre étude appartiennent à quatre familles différentes. SitABCD et ZnuACB sont des perméases ABC dépendantes d'une protéine de liaison périplasmique, MntH est un homologue de Nramp des eucaryotes, FeoABC est une GTP-ase de transport, alors que ZupT est un transporteur de la famille Zip. L'architecture moléculaire de ces familles de transporteurs et leurs mécanismes de transport différent, ce qui doit nécessairement se traduire par des efficacités de transport différentes dans les diverses niches anatomiques dans lesquelles pourraient évoluer les souches ExPEC pendant le processus infectieux. (Sections IIIk, IIII, IVI, IVm et Vj de la revue de littérature)

Avant tout, il faut mentionner que les transporteurs ont des efficacités de transport variant d'un environnement donné à un autre. Ainsi, FeoABC est un transporteur de Fe^{2+} très efficace en anaérobiose, le transport du manganèse par SitABCD est plus efficace dans les milieux alcalins, alors que MntH est plus efficace en milieux acides. Les propriétés physicochimiques du transport par ZnuACB et ZupT ne sont pas assez bien connues pour pouvoir définir les caractéristiques des milieux dans lesquels leur fonctionnement est optimal. De plus, la nature de l'énergie utilisée par le transporteur pour faire passer son substrat du périplasme au cytoplasme varie d'une famille de transporteurs à l'autre. Comme leur nom l'indique, les transporteurs ABC (*ATP Binding Cassette*) dépendent de l'hydrolyse de l'ATP, FeoABC est énergisé par l'hydrolyse du GTP, alors que MntH et ZupT dépendent du gradient chimiosmotique (protons pour MntH, possiblement carbonates pour ZupT).

Il est vraisemblable que dans certaines conditions, une des sources d'énergie soit plus facilement accessible qu'une autre. Par exemple, le gradient chimiosmotique dépend de l'intégrité de la membrane cytoplasmique et peut donc être affecté par les stress qui affectent cette intégrité, alors que l'ATP est en général présent dans le cytoplasme de toutes les cellules viables et est donc disponible indépendamment des caractéristiques du milieu extracellulaire.

Enfin, l'affinité du transporteur dépend aussi de l'architecture moléculaire de celui-ci. Ainsi, comme nous l'avons mentionné dans la revue de littérature, les transporteurs ABC des bactéries Gram négatives comprennent une protéine périplasmique de liaison qui permet d'augmenter l'affinité du transporteur pour son substrat cible et accroît l'efficacité du transport en dirigeant ce substrat vers la perméase membranaire. C'est pour cela que ces transporteurs sont

capables de transférer leurs substrats cibles contre le gradient de concentration avec un facteur d'accumulation de 10^6 . Chez les bactéries Gram positives le même rôle est joué par des lipoprotéines attachées à la paroi cellulaire. Par contre, les transporteurs tels que MntH, ZupT et FeoB ne contiennent pas de composante protéique capable de concentrer le substrat à transporter au niveau de la perméase membranaire, ce qui diminue leurs efficacités de transport en leur permettant un facteur d'accumulation de 10^3 seulement. (Section VI c de la revue de littérature) Ceci ne signifie pas que l'utilisation des transporteurs ABC sera toujours plus appropriée. Étant donné que ces transporteurs sont coûteux en énergie (2 ATP pour chaque ion métallique importé), il est probable que dans certaines conditions les transporteurs énergisés par les gradients chimiosmotiques seront plus rentables.

Les résultats que nous avons obtenus *in vitro* en ce qui concerne l'accumulation des isotopes radioactifs par les transporteurs MntH et SitABCD, démontrent que MntH apparaît comme étant un transporteur de manganèse plus efficace que SitABCD. Par ailleurs, SitABCD est un transporteur bien plus efficace dans l'acquisition du fer ferreux que du fer ferrique. (Tableau 3 de l'article 1.) De plus, du point de vue de l'affinité apparente, SitABCD a une meilleure affinité pour le fer ferrique suivi du fer ferreux dans une souche déficiente en transport du fer et une meilleure affinité pour le manganèse suivi du fer ferreux dans une souche déficiente dans le transport du manganèse. (Figure 5 de l'article 1.)

Donc, la présence d'autres transporteurs dans la souche influence l'affinité de SitABCD. En effet, en absence de MntH, SitABCD aura tendance à acquérir le manganèse, alors que le fer sera transporté par d'autres transporteurs. En absence de FeoB et du transport de l'entérobactine, SitABCD aura tendance à transporter le fer, alors que le manganèse sera transporté par MntH. Il est à noter que ces estimations de l'efficacité et de l'affinité du transport ont été obtenues pour des transporteurs exprimés à partir des plasmides. Il est probable que quand les transporteurs sont exprimés à partir du chromosome leur efficacité et leur affinité sont quelque peu différentes. De plus, les valeurs d'affinité apparente et d'efficacité de transport ont été obtenues *in vitro*, ces mêmes caractéristiques peuvent être différentes *in vivo*. Nous devons donc considérer les valeurs de l'affinité apparente et de l'efficacité de l'accumulation des isotopes, obtenues *in vitro* avec un nombre de copies d'opéron différent de celui du génome, comme étant des indications de la capacité d'un transporteur à transporter certains ions et non pas en tant que valeurs absolues

s'appliquant au fonctionnement de ce transporteur dans tous les milieux. Et il serait exagéré de considérer ces valeurs comme étant le reflet exact de ce qui se passe *in vivo*.

En ce qui concerne le transport du zinc par des transporteurs exprimés à partir des plasmides, le transporteur le plus efficace dans l'acquisition de ce métal *in vitro* semble être ZupT. ZnuACB semble être légèrement moins efficace que ZupT, bien que cette différence ne soit pas significative. Même SitABCD semble capable d'acquérir l'isotope du zinc. Par contre, quand les transporteurs sont exprimés à partir du chromosome, ZnuACB est clairement le transporteur majeur de zinc, alors que ZupT apparaît comme étant secondaire et SitABCD perd sa capacité à accumuler le zinc. (Figure 3 de l'article 3.)

Ceci confirme l'observation que nous avons exprimée précédemment, à savoir que la capacité d'un transporteur d'acquérir un transporteur *in vitro* ne signifie pas qu'il en sera capable *in vivo*. De plus, l'expression des transporteurs à partir de plasmides à un nombre de copies supérieur à celui des gènes encodés au niveau du chromosome, a effectivement tendance à exagérer la capacité d'un transporteur à accumuler un métal. Enfin, la capacité d'un transporteur à accumuler un métal n'est pas une garantie de sa capacité à le transporter d'une façon efficace et permettant de contribuer à la physiologie cellulaire. En effet, dans le cas de SitABCD, la capacité d'accumuler l'isotope radioactif de zinc est présente, mais la capacité de fournir à la cellule le zinc dont elle a besoin pour croître est absente. Ceci peut probablement s'expliquer par la capacité de la protéine périplasmique de liaison SitA de capter les ions de zinc, tout en étant incapable de le transmettre à la perméase SitCD, ou par l'incapacité de la perméase de transporter le zinc transmis par SitA vers le cytoplasme. Ainsi, SitABCD accumulerait l'isotope de zinc dans le périplasma, mais cette accumulation serait inutile, voir carrément nuisible puisqu'elle pourrait empêcher SitABCD de transporter le manganèse et le fer. Il est à noter que le transport par SitABCD de *S. Typhimurium* était aussi inhibé par le zinc et que cette inhibition était indépendante du pH. [236]

Ces résultats rejoignent ceux fournis par les expériences de croissance bactérienne en milieu appauvri en ions métalliques pour nous indiquer que les différents transporteurs des ions métalliques, exprimés par les souches d'*E. coli* forment un ensemble hiérarchisé, en ce sens qu'en fonction des conditions présentes dans un milieu donné, certains transporteurs seront utilisés en priorité pour acquérir un substrat donné. Par conséquent, certains transporteurs seront certainement plus importants que d'autres dans un milieu donné et il en sera certainement ainsi *in*

vivo. Par ailleurs, ces résultats démontrent que les valeurs obtenues *in vitro* et caractérisant l'affinité, la vitesse de transport et l'efficacité d'accumulation d'un métal par un transporteur peuvent servir d'indication de la capacité d'un transporteur à acquérir un métal, mais ne sont certainement pas un reflet parfait de l'activité de ce transporteur *in vivo*. Toutes ces valeurs sont dépendantes des conditions expérimentales qui ne peuvent refléter la complexité du milieu interne de l'organisme hôte.

IX c Stress oxydatif :

Les ions métalliques sont reliés au stress oxydatif. Le fer est impliqué dans les réactions de la chimie de Fenton, tout en étant le cofacteur enzymatique de la superoxyde-dismutase à fer et des catalases. Le manganèse est le cofacteur enzymatique de la superoxyde-dismutase à manganèse tout en ayant des propriétés anti-oxydantes non-enzymatiques. Le zinc est un élément structural de la superoxyde-dismutase périplasmique à zinc et cuivre (SodC), de la chaperonne Redox sensible Hsp33 et du régulateur transcriptionnel Fur qui permet de réprimer le transport du fer. Le zinc a de plus un effet antioxydant de protection des lipides de la membrane cellulaire, contre l'accolement des cations du fer qui pourraient provoquer la peroxydation des lipides et donc fragiliser la membrane. (Sections IIIh, IVp et Vm de la revue de littérature)

La capacité de résister au stress oxydatif est très importante *in vivo*, puisque les radicaux réactifs de l'oxygène sont générés par les cellules immunitaires lors de la lutte de l'hôte contre les bactéries pathogènes. Nous avons étudié l'influence des transporteurs MntH, SitABCD, ZupT et ZnuACB sur la résistance au stress oxydatif. Nos résultats indiquent que le transport de manganèse et du zinc est important pour la résistance contre le stress oxydatif. (Figure 6 de l'article1, Figure 5 des articles 2 et 3.)

La perte du transporteur MntH provoque une baisse de résistance à la toxicité du peroxyde d'hydrogène dans la souche mutante dérivée de la souche K-12 χ 289. SitABCD ou MntH exprimés à partir d'un plasmide sont tous les deux capables de compléter cette baisse de résistance. Il en va de même chez la souche APEC χ 7122, chez laquelle la perte de SitABCD ou de MntH n'entraîne pas de baisse de résistance au stress oxydatif provoqué par le peroxyde d'hydrogène, puisque l'autre transporteur toujours actif est capable à lui seul d'assurer le transport de manganèse nécessaire à cette résistance. (Figure 6 article 1) Par contre, la souche mutante APEC qui a perdu les deux transporteurs MntH et SitABCD devient aussi sensible au

stress oxydatif que l'est la souche mutante K-12 qui a perdu MntH. Ces résultats obtenus avec le peroxyde d'hydrogène, sont corrélés par ceux obtenus avec les produits produisant l'anion superoxyde : plumbagine et paraquat. (Figure 5 de l'article 2) Dans ce cas aussi, la souche mutante qui a perdu MntH et SitABCD a été plus susceptible au stress oxydatif que la souche APEC parentale. Cette sensibilité au stress était plus apparente sur le milieu minimal défini M9 dans lequel les ions métalliques et en même temps la quantité de la matière organique sont plus rares. En effet, les ions métalliques plus abondants auraient pu être acquis à travers les systèmes de transport de faible affinité et la matière organique présente dans un milieu plus riche (par exemple le milieu LB-agar) aurait pu tamponner les radicaux réactifs d'oxygène en diminuant ainsi leur toxicité.

Par contre, la souche déficiente en transport du manganèse n'a pas démontré de sensibilité accrue à la phénazine méthosulfate (PMS). (Figure 5 article 2.) La phénazine méthosulfate ne provoque pas le stress oxydatif en libérant des radicaux libres d'oxygène, mais en oxydant directement les noyaux fer-soufre des métalloprotéines et en relâchant ainsi dans le cytoplasme du fer qui sera subséquemment impliqué dans les réactions de Fenton. Il est possible que la toxicité de la PMS ne peut être prévenue par la présence du manganèse et que par conséquent les transporteurs de manganèse SitABCD et MntH ne sont pas réellement importants pour la protection contre ce type de stress oxydatif.

En ce qui concerne le mécanisme par lequel le manganèse contribue au stress oxydatif, il peut s'agir du mécanisme enzymatique, le manganèse jouant le rôle de cofacteur de la superoxyde-dismutase, ou encore d'un mécanisme non-enzymatique dans lequel le manganèse, tout en tamponnant les radicaux libres dans le cytoplasme, déplace le fer des métallo-enzymes et les rend ainsi moins sensibles aux réactions de la chimie de Fenton. (Section Vm de la revue de littérature) En effet, nous avons mentionné lors de la revue de littérature que des quantités élevées de manganèse (de l'ordre du mM), peuvent être accumulées rapidement par *S. enterica* Typhimurium. [20] Il semblerait que certaines métallo-enzymes fer-dépendantes peuvent utiliser le manganèse en tant que cofacteur sans perte d'efficacité, mais l'affinité de l'apoenzyme envers le manganèse serait plus faible qu'envers le fer. Quand la quantité du manganèse dans la cellule devient nettement plus importante que celle du fer, l'affinité des apoenzymes pour le manganèse pourrait devenir suffisante pour remplacer le fer et prévenir ainsi l'inactivation de l'enzyme par le stress oxydatif. [20, 31] De plus, le fer remplacé pourrait être stocké ou rejeté à l'extérieur de la

cellule de façon à diminuer l'occurrence des réactions de la chimie de Fenton. Enfin, les ions de manganèse présents dans le cytoplasme pourraient agir en tant que substitut de la superoxyde-dismutase et tamponner ainsi les radicaux réactifs d'oxygène.

En ce qui concerne les transporteurs de zinc, la perte de ZnuACB a provoqué la baisse de la résistance de la souche mutante dérivée de la souche UPEC CFT073 au stress oxydatif dû à la présence du peroxyde d'hydrogène. La souche qui a perdu ZupT, mais a conservé un ZnuACB fonctionnel, était aussi résistante au stress oxydatif que la souche de type sauvage. La souche qui a perdu ZnuACB et ZupT n'était capable de pousser sur le milieu minimal M9 qu'après ajout de 5 μM de ZnCl_2 et était aussi sensible au stress oxydatif que celle qui a perdu SitABCD et MntH, sa sensibilité était donc plus forte que celle de la souche ayant perdu ZnuACB. (Figure 5 de l'article 3.) La résistance de cette souche était complétée au niveau sauvage par l'ajout de 10 μM de ZnCl_2 , par contre la souche mutante dépourvue de SitABCD et MntH n'a pas été complétée par l'ajout de zinc. Ceci démontre que le zinc supplémentaire n'agit en tant qu'antioxydant que chez les souches qui ont perdu les transporteurs spécifiques de ce métal et que l'action antioxydante du zinc dépend d'un mécanisme spécifique. Le mécanisme par lequel le zinc améliore la résistance au stress oxydatif peut être soit enzymatique, puisque le zinc est l'élément structural de la superoxyde-dismutase, soit non-enzymatique en impliquant une ou plusieurs des nombreuses métalloprotéines zinc-dépendantes.

La superoxyde-dismutase périplasmique à zinc et cuivre SodC (Cu Zn Sod) est très importante pour la protection des cellules bactériennes contre le stress oxydatif. En effet, la détoxification des radicaux réactifs d'oxygène dans le périplasme permet d'éviter que ceux-ci n'affectent la membrane interne, ni ne perturbent le fonctionnement des métalloprotéines et métallo-enzymes cytoplasmiques. (Section IIIh de la revue de la littérature) Il a été démontré que la Cu Zn Sod était importante pour la survie des souches entérohémorragiques d'*E. coli*. [92] Il a été de plus démontré que ZnuA est capable d'interagir avec la Cu Zn Sod. [175] Bien que cette interaction correspondait à un transfert du Zn^{2+} de la Cu Zn Sod vers ZnuA, rien n'interdit de penser que dans certaines conditions le transfert inverse soit possible. Dans un tel cas, ZnuA servirait non seulement d'élément structural d'un transporteur, mais aussi de chaperonne périplasmique distribuant le Zn^{2+} aux multiples métallo-enzymes zinc-dépendantes présentes dans le cytoplasme.

Fur est une métalloprotéine zinc-dépendante, qui est inactivée lors de la perte du zinc structurel faisant partie de sa structure protéique. [162, 392] Le stress oxydatif relâche le fer contenu dans les métalloprotéines et métallo-enzymes fer-dépendantes, la quantité de fer libre cytoplasmique augmente ce qui entraîne des réactions de Fenton et l'accroissement du stress oxydatif. (Section IVp de la revue de littérature) Le répresseur Fur intervient pour diminuer la quantité de fer disponible en inhibant l'import du fer. En absence de Fur, le stress oxydatif est très fortement accru et les mutants Δfur ont une sensibilité très forte au stress oxydatif. [248] Pour synthétiser de nouvelles protéines Fur fonctionnelles la cellule a besoin de zinc, d'ailleurs l'opéron *znuACB* est induit dans un milieu riche en fer. En absence des transporteurs de zinc les nouvelles protéines fonctionnelles de Fur sont moins disponibles et la cellule se retrouve dans une situation similaire à celle du mutant Δfur .

La chaperonne Hsp33 est zinc-dépendante et très importante pour la réparation des protéines dénaturées par différents stress cellulaires. Étant donné que Hsp33 est aussi un senseur de stress oxydatif, elle pourrait aussi être impliquée dans la résistance zinc-dépendante au stress oxydatif. [255]

On ne peut affirmer avec certitude que le mécanisme permettant au zinc d'alléger le stress oxydatif soit un des trois décrits plus haut ou une combinaison de ces mécanismes. Mais il apparaît lors des études transcriptomiques, que nous avons décrites dans la revue de la littérature, qu'en absence de zinc (chélaté par le TPEN) le stress oxydatif est plus fort et les protéines de transport de fer induites, alors qu'en présence de zinc en quantité élevée dans un chémostat le stress oxydatif soit faible. (Section IIIh de la revue de la littérature) Par conséquent, quelque soit le mécanisme exact de l'action anti-oxydante de zinc, il semble clair qu'en absence d'un transport fonctionnel de zinc, les souches ExPEC seront probablement plus sensibles au stress oxydatif généré par le système immunitaire *in vivo*.

IX d Motilité :

Une autre métalloprotéine zinc-dépendante est FlhC qui régule avec FlhD l'expression des flagelles et la motilité bactérienne. [168, 393] L'étude transcriptionnelle menée dans un milieu appauvri en zinc (par le chélateur TPEN) a montré une baisse de la production des flagelles, par contre celle menée en présence d'une forte quantité de zinc dans un chémostat a montré une induction des gènes impliqués dans la production des flagelles et la motilité. (Section

IIIh de la revue de la littérature) Il semble donc que la présence de zinc soit corrélée avec une utilisation accrue des flagelles. Nous avons donc investigué si l'absence des transporteurs de zinc correspondait chez *E. coli* à une baisse de la motilité. Effectivement, le mutant ayant perdu la capacité d'exprimer ZnuACB et ZupT et dépourvu donc des moyens d'acquisition du zinc, était nettement moins motile que la souche parentale UPEC CFT073. Ce défaut de motilité n'était pas observé quand l'un des deux transporteurs de zinc était encore fonctionnel. Le défaut de motilité était aussi renversé par l'ajout de 5 μM de ZnCl_2 au milieu utilisé lors des tests de motilité. Étant donné que la motilité est importante lors des infections extra-intestinales, il est possible qu'une capacité réduite d'acquérir le zinc rende les mutants dérivés des souches ExPEC moins aptes à coloniser les niches anatomiques extra-intestinales de l'organisme hôte. En particulier, la motilité des UPEC devrait être importante dans les infections ascendantes du tractus urinaire, pendant lesquelles les cellules bactériennes doivent remonter le tractus urinaire, sans se laisser entraîner par le flux de l'urine. [387]

IX e Virulence :

Comme nous l'avons indiqué précédemment, l'efficacité d'un transporteur *in vitro* n'est pas nécessairement corrélée avec son importance pour la virulence *in vivo*. En effet, MntH semble plus efficace que SitABCD en ce qui concerne le transport du manganèse *in vitro*, mais c'est bien SitABCD qui est le plus important des deux transporteurs *in vivo* puisque sa perte entraîne une baisse de la virulence de la souche pathogène aviaire d'*Escherichia coli* (APEC) $\chi 7122$ dans le modèle expérimental de la colibacillose aviaire. De même, ZupT apparaît au moins aussi efficace que ZnuACB en ce qui concerne le transport de Zn^{2+} *in vitro*, mais ZnuACB a été le plus important des deux transporteurs *in vivo*. Il apparaît donc que l'efficacité de transport *in vitro* n'est pas la seule à définir l'importance d'un transporteur pour la virulence. Il est donc intéressant d'envisager quels peuvent être les autres facteurs qui influencent l'importance d'un transporteur *in vivo*.

Avant tout, il est possible que l'absence de certains transporteurs soit corrélée avec une capacité moindre de croître *in vivo*, surtout lors des co-infections, quand les cellules bactériennes mutantes sont en compétition directe pour les ions métalliques avec les cellules parentales de type sauvage. La présence des bactéries de type sauvage agit dans ce cas en tant que facteur limitant supplémentaire. De plus, il est possible que d'autres phénotypes dépendants des métaux affectent

la virulence. Nous avons cités deux de ces phénotypes : la baisse de la résistance au stress oxydatif et la baisse de la motilité.

Quelque soit réellement le facteur, ou la combinaison des facteurs, affectant la virulence des souches déficientes dans le transport des ions métalliques, dans le cas des infections que nous avons étudiées, les transporteurs ABC : SitABCD et ZnuACB, sont clairement plus importants pour la virulence que les transporteurs des ions divalents de manganèse, fer et zinc appartenant à d'autres familles protéiques.

En effet, les mutants Δsit de la souche APEC $\chi 7122$ et Δznu de la souche UPEC CFT073, ont été atténués durant les infections dans leurs modèles expérimentaux respectifs, alors que les mutants $\Delta mntH$ et $\Delta zupT$ n'ont pas été atténués. (Figures 2 et 3 de l'article 3. Figure 4 de l'article 3) En fait, le mutant $\Delta zupT$ de la souche UPEC CFT073 a été légèrement plus virulent que la souche parentale sauvage. D'autre part, le mutant Δfeo de la souche APEC $\chi 7122$ a été atténué dans le sang, mais pas dans d'autres niches anatomiques. Enfin, la perte conjointe d'un transporteur ABC et d'un autre transporteur capable de transporter le même substrat ionique avait un effet potentialisant sur l'atténuation de la virulence. Tel a été le cas pour la perte de MntH dans une souche incapable d'utiliser SitABCD (double mutant $\Delta sit/\Delta mntH$ de la souche APEC $\chi 7122$) et de la perte de ZupT dans une souche incapable d'utiliser ZnuACB (double mutant $\Delta znu/\Delta zupT$ de la souche UPEC CFT073). Par contre, le double mutant ayant perdu la fonction de FeoABC et MntH chez la souche APEC $\chi 7122$, n'était pas atténué, démontrant que SitABCD est plus important pour la virulence APEC que ces deux transporteurs réunis. De plus, la perte conjointe de FeoB dans une souche ayant perdu la capacité d'utiliser SitABCD (double mutant $\Delta sit/\Delta feoB$ de la souche APEC $\chi 7122$), a conduit à un regain de virulence dans le foie par rapport au mutant ayant perdu la fonction de SitABCD, démontrant que dans certaines niches anatomiques le fonctionnement d'un transporteur peut affaiblir la virulence. Ces résultats démontrent le rôle crucial des transporteurs ABC pour l'acquisition des ions Mn^{2+} et Zn^{2+} , ainsi que leur prépondérance dans les processus infectieux comparativement aux autres transporteurs.

IX f Transporteurs ABC et transporteurs dépendants du gradient chimiosmotique :

Nous avons décrit dans la revue de la littérature les différences de mécanisme de transport entre les transporteurs ABC et les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques. (Section VI de la revue de la littérature) Les résultats que nous avons obtenus lors des infections

expérimentales démontrent que le mécanisme de transport des perméases ABC est plus efficace *in vivo* que celui des transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques. (Figures 2 et 3 de l'article 3. Figure 4 de l'article 3) Par contre *in vitro*, les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques sont très efficaces et accumulent les solutés cibles aussi bien, ou même mieux que les transporteurs ABC. (Tableau 3 de l'article 1, figure 5 de l'article et figure 3 de l'article 3.) Il y a donc une contradiction entre les efficacités réciproques de ces deux types de transporteurs *in vivo* et *in vitro*.

Le mécanisme de transport des perméases ABC dépend de l'ATP, le mécanisme de transport des transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques, est tributaire de l'existence d'un tel gradient de part et d'autre de la membrane cytoplasmique. Advenant le cas où le gradient du substrat cotransporté est perturbé, la perturbation se répercutera sur le transport du soluté. *In vivo*, plusieurs facteurs peuvent perturber les gradients chimiosmotiques existant entre le périplasma et le cytoplasme. Par exemple, les changements de pH, d'osmolarité du milieu et l'action du système immunitaire sur la membrane externe peuvent tous induire des changements dans ces gradients. Les transporteurs énergisés par le gradient chimiosmotiques sont donc probablement moins efficaces *in vivo*, car la source de l'énergie pour le transport dépend des caractéristiques de l'environnement. (Section VI)

Par contre, les transporteurs ABC ont besoin pour fonctionner que de l'ATP, ils sont donc indépendants des fluctuations des caractéristiques physicochimiques du milieu. Ceci suggère que les perméases ABC pourraient être plus utiles lors de l'adaptation à des caractéristiques physicochimiques changeantes. Il est à noter que lors du développement du processus infectieux par les bactéries pathogènes, celles-ci font justement face à des conditions physicochimiques très changeantes. (Section VI)

Les transporteurs ABC sont donc non seulement plus aptes à acquérir leurs solutés cibles, mais ils doivent de plus être d'une utilisation plus fiable *in vivo* que les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques. Mais il doit y avoir une explication de l'utilité des transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques pour les cellules d'*E. coli*, qui possèdent par ailleurs des perméases ABC. Cette explication est suggérée par la capacité des transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques d'acquérir efficacement leurs solutés cibles *in vitro*.

Nous pensons que l'explication tient dans le fait que l'utilisation des transporteurs ABC est probablement plus coûteuse en énergie que celle des transporteurs dépendants des gradients

chimiosmotiques. En effet, les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques sont constitués d'une protéine membranaire unique, alors que les transporteurs ABC sont constitués de trois à quatre protéines différentes, donc la synthèse des transporteurs ABC est plus coûteuse du point de vue de l'énergie investie par la cellule. De plus, quand les gradients chimiosmotiques sont stables, le fonctionnement des transporteurs dépendants de ces gradients est très économique du point de vue de l'énergie, alors que dans le cas d'un transporteur ABC il faudra dépenser deux molécules d'ATP pour importer un soluté cible. Par ailleurs, les transporteurs ABC qui sont des systèmes formés de plusieurs protéines peuvent être plus encombrants au niveau de la membrane cytoplasmique que les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques qui sont formés d'une protéine membranaire unique. Des transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques, pourront probablement être exprimés par une bactérie en plus grand nombre que les transporteurs ABC, tout en assurant l'intégrité de la membrane. Enfin, les PLBPs des perméases ABC peuvent perturber le fonctionnement d'autres protéines périplasmiques qui dépendent, du soluté qui est acquis avec une très haute affinité par le transporteur ABC. Ce fut le cas lors de l'interaction entre SodC et ZnuA : quand ces deux protéines ont été coexprimées ZnuA entrain en compétition avec SodC pour Zn^{2+} et affectait le fonctionnement de cette enzyme périplasmique.

Les transporteurs dépendants des gradients sont donc d'une utilisation plus aisée, mais moins efficace. Dans un milieu aux propriétés physicochimiques stables et dans lequel le soluté transporté est peu abondant, mais présent à une concentration qui n'est pas inférieure à mille fois celle du cytoplasme, les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques seront des excellents outils. Exprimés en grand nombre, ils combleront les besoins de la cellule sans une grande dépense d'énergie.

Par contre, les perméases ABC sont d'une grande efficacité, mais coûteuses à utiliser. Elles seront surtout utiles dans des milieux aux conditions physicochimiques changeantes et très pauvres en soluté cible que les perméases ABC pourront acquérir même si sa concentration dans le milieu est un million de fois inférieure à celle du cytoplasme.

Par conséquent, la cellule bactérienne utilise les transporteurs dépendants des gradients chimiosmotiques en tant que moyen économique d'obtenir les solutés dont elle a besoin. Les perméases ABC sont utilisées en tant qu'outil coûteux, mais de haute efficacité, dans les environnements où le soluté cible est rare et les conditions physicochimiques changeantes. Les

différentes niches anatomiques du milieu interne de l'organisme hôte, dans lesquelles se retrouvent les souches ExPEC lors du processus infectieux, sont justement un environnement aux propriétés physicochimiques changeantes ou les métaux sont rares.

IX h Synthèse de la discussion :

Nos expériences ont démontré que les souches ExPEC ont besoin des transporteurs des ions métalliques divalents pour survivre *in vivo*. Les différents transporteurs permettant l'acquisition des cations divalents du fer, manganèse et zinc forment un ensemble adapté à l'obtention de ces métaux dans les différents milieux naturels et niches anatomiques dans lesquels évoluent les souches ExPEC. Ces transporteurs ne sont pas équivalents, certains sont plus importants que d'autres dans un milieu donné.

En particulier, les transporteurs ABC se sont avérés être les plus importants en ce qui concerne l'acquisition des métaux *in vivo*. En absence de ces transporteurs, les souches ExPEC ne peuvent concurrencer l'organisme hôte pour l'obtention de ces ions métalliques qui sont impliqués dans le fonctionnement des métallo-enzymes et autres types de métalloprotéines. Les métallo-enzymes et les autres métalloprotéines sont impliquées dans tous les aspects du métabolisme cellulaire bactérien et leur carence provoque chez les souches ExPEC des effets pléiotropiques ayant un impact sur la virulence.

Parmi les aspects les plus importants des effets du manque des ions métalliques, la diminution de la résistance au stress oxydatif (dans le cas du manganèse et zinc) et la diminution de la motilité (dans le cas du zinc), suffisent à expliquer la diminution de la virulence des souches mutantes ayant perdu le moyen d'acquérir le zinc et le manganèse. Nos résultats démontrent l'importance du manganèse et du zinc en tant qu'éléments indispensables pour le métabolisme d'*E. coli* et la virulence des souches ExPEC ainsi que l'importance que revêt l'utilisation des transporteurs ABC pour l'obtention des ions métalliques.

Enfin, pour en revenir au métallome, il semblerait que la cellule est capable d'ajuster l'ensemble de ces ions de fer, manganèse et zinc, de façon à faire face à différents stress rencontrés *in vivo*. En particulier, il est possible que la quantité de fer cellulaire diminue, alors que la quantité de manganèse augmente lors du stress oxydatif. Il est aussi possible que la diminution du fer soit connectée à l'utilisation du zinc.

IX i Perspectives :

Nos résultats suggèrent fortement que les transporteurs ABC forment une cible prioritaire dans la recherche des moyens de combattre les souches ExPEC et de guérir ou prévenir les infections causées par ces souches. Nous pensons que l'inactivation des transporteurs ABC permettrait de tuer les souches ExPEC, ou du moins de les rendre suffisamment atténuées pour que le système immunitaire puisse les éliminer. Étant donné que les cellules mammifères ne possèdent pas de transporteurs ABC semblables à ceux des procaryotes, il nous paraît possible de cibler spécifiquement les transporteurs ABC procaryotes pour le développement de nouveaux produits bactéricides. Nous pensons aussi que les souches qui auraient perdu l'usage d'un ou plusieurs transporteurs ABC, seraient de bons candidats pour le développement de vaccins vivants atténués. Nous allons élaborer plus sur chacune de ces deux perspectives.

IX k Inactiver les transporteurs ABC :

Les transporteurs ABC bactériens ont une architecture moléculaire conservée, même si leurs séquences protéiques varient. Ainsi l'interaction entre la protéine périplasmique (ou la lipoprotéine) de liaison au soluté (PLBP pour *Periplasmic Ligand Binding Protein*) et la perméase de la membrane interne est une constante des transporteurs ABC chargés de l'import des substrats dans les cellules bactériennes. Sans cette interaction le transport des substrats est impossible. Il est probable que le mécanisme de cette interaction soit très semblable, voire même identique, entre les différents transporteurs. Bloquer cette interaction revient à inactiver le transporteur. Identifier ce mécanisme, puis apprendre à le bloquer serait la voie à prendre pour créer des antibiotiques dirigés contre les transporteurs ABC.

Pour comprendre le mécanisme d'interaction, la première étape serait d'identifier les acides aminés conservés et variables chez les différentes PLBPs, étant donné leur conservation certains de ces acides aminés pourraient être importants pour l'interaction avec la perméase, étant donné leur variation certains autres pourraient assurer la spécificité de la reconnaissance entre PLBP et perméase. La seconde étape consisterait à muter ces acides aminés, puis de vérifier si les transporteurs sont encore fonctionnels. Dans le cas où la mutation d'un ou plusieurs acides aminés abolirait la fonction du transporteur on peut conclure qu'ils sont indispensables. La troisième étape consisterait à créer des peptides consensus dérivés de l'alignement de plusieurs PLBPs et contenant l'acide aminé indispensable. La quatrième et dernière étape consisterait à

vérifier si la présence de ces peptides dans le milieu de culture interférerait avec le fonctionnement du transporteur. En effet ces peptides pourraient jouer le rôle de « leurres » entrant en concurrence avec les véritables PLBPs pour la liaison à la perméase.

La même approche pourrait être appliquée à différentes protéines de perméases de la membrane interne. Dans ce cas les peptides obtenus seraient des « leurres » qui concurrenceraient les perméases pour la liaison des PLBPs.

Une autre manière d'identifier le moyen d'inactiver le transport par les transporteurs ABC serait d'utiliser différentes PLBPs purifiées pour identifier les différents peptides capables de s'accoler à celles-ci. Ces peptides pourraient être identifiés par la technique de présentation des peptides par l'intermédiaire d'un phage (*Phage display*). Si un ensemble de peptides est identifié pour chacune des plusieurs PLBPs, il sera probablement possible de retrouver des peptides consensus capables de s'accoler à plusieurs PLBPs. Certains de ces peptides pourraient probablement inactiver l'interaction PLBPs-perméase chez différents transporteurs ABC.

IX I Utiliser les souches mutantes en tant que vaccin vivant atténué :

La perte des transporteurs ABC des cations métalliques atténue les souches virulentes d'*E. coli* dans les milieux pauvres en ions métalliques. C'est en particulier le cas des niches anatomiques extra-intestinales du milieu interne de l'organisme hôte, dans lequel se retrouvent les souches ExPEC lors de l'établissement du processus infectieux. Par contre, la perte de ces transporteurs ne risque pas de rendre ces souches moins immunogènes puisque ces transporteurs sont composés de sous unités périplasmiques et de membrane interne et que par conséquent la perte des transporteurs ABC n'affecte pas les antigènes de surface de ces souches. En fait, il est possible que certains récepteurs de surface impliqués dans l'acquisition des métaux et fortement immunogènes, par exemple les protéines IROMP (pour *Iron Regulated Outer Membrane Proteins*), induites par la carence en fer, soient plus exprimées dans ces souches qui sont carencés en ions métalliques. Les IROMP sont exprimées par les bactéries Gram négatives dans les milieux pauvres en fer, ces protéines sont reconnues par les cellules immunitaires. Leur expression accrue par ces souches vaccinales devrait servir à renforcer l'immunité anti-ExPEC. [398]

En particulier, nous pensons que les souches mutantes $\Delta znu/\Delta sit$ dérivées des ExPEC seraient de bons candidats pour des vaccins vivants atténués. Ces vaccins pourraient être d'une

grande utilité dans le cas de certaines infections humaines récurrentes, par exemple les infections du tractus urinaire. Ces vaccins pourraient aussi être utilisés en médecine vétérinaire pour la prévention des maladies causées par les souches ExPEC chez les animaux. Une des difficultés sur le chemin de la production des vaccins vivants atténués sur la base des ExPEC est la diversité des infections causées par ce groupe de souches. Il est donc plausible que les mécanismes immunitaires que les souches ExPEC rencontreront lors de l'établissement du processus infectieux seront divers. Par exemple, les anticorps IgA sécrétoires devraient jouer un rôle important lors des stages initiaux des infections, avant que les souches ExPEC ne passent dans le flux sanguin, par la suite lors du stage systémique ce sont les IgG qui devraient être plus importants. Les vaccins devraient donc stimuler autant la production des IgG que des IgA. Quoiqu'il en soit, il est clair que l'évaluation de ces souches du point de vue immunologique dépasse le cadre de cette recherche, mais nous avons espoir que des études futures pourront éclairer ce sujet.

X Conclusion

Les ions métalliques peuvent être bénéfiques ou toxiques pour les cellules eucaryotes et bactériennes. Les ions toxiques sont rejetés par les cellules. Les ions bénéfiques sont utilisés en tant que cofacteurs enzymatiques des métallo-enzymes, ou éléments structuraux des autres métalloprotéines. Les métalloprotéines sont impliquées dans tous les aspects du métabolisme cellulaire. L'ensemble des ions métalliques faisant partie du métabolisme cellulaire peut être nommé métallome, par analogie aux autres grands ensembles compris dans le métabolisme cellulaire : génome, transcriptome, protéome. Sans le contrôle de la composition du métallome, la préservation de l'homéostasie cellulaire est impossible. En effet, même s'ils sont indispensables les ions métalliques bénéfiques peuvent être toxiques en excès. C'est pour cela que les cellules possèdent de multiples transporteurs capables d'acquérir des ions métalliques et d'autres capables de les rejeter. C'est aussi pour cela que l'expression de ces transporteurs par les cellules, est contrôlée au niveau génétique, non seulement en fonction de la quantité d'un métal donné présent dans la cellule, mais aussi en fonction des multiples facteurs environnementaux qui peuvent affecter le métallome.

Au niveau de l'organisme des vertébrés, l'homéostasie des différents métaux est soumise à un contrôle complexe. Ce contrôle permet de balancer l'acquisition des différents métaux bénéfiques pour l'organisme avec leur utilisation par les cellules des différents organes et les pertes par excrétion. Ce contrôle fait intervenir les messagers hormonaux dans l'expression des protéines ligands sériques, des récepteurs et transporteurs membranaires et des protéines cellulaires de stockage des métaux. De plus, ce contrôle est intimement connecté au fonctionnement des mécanismes de la défense immunitaire. En effet, la monopolisation des métaux pour les besoins des cellules de l'organisme hôte et la réduction de la quantité des métaux disponibles aux pathogènes potentiels, sont deux aspects d'un mécanisme important de la défense immunitaire innée. Ainsi dans le cas d'une infection, le système immunitaire contribue à une forte diminution du fer ou du zinc disponibles dans le plasma sanguin des mammifères et au stockage de ces deux métaux dans le foie.

Parallèlement à l'existence de ces défenses de l'hôte, les bactéries pathogènes possèdent de multiples mécanismes de transport des ions métalliques, qui leur permettent de les acquérir dans les différents milieux et niches anatomiques dans lesquels se déroule leur cycle de vie. Plusieurs des récepteurs et systèmes de transport protéiques intervenant dans l'acquisition des métaux par les bactéries, ont été impliqués dans leur virulence. On peut donc parler d'une

compétition hôte pathogène pour les ions métalliques, qui sont indispensables à leur homéostasie cellulaire.

Les souches extra-intestinales pathogènes d'*E. coli* (ExPEC) causent des nombreuses infections différentes chez l'humain et les animaux. Pendant leur cycle de vie, ces souches passent du lumen gastro-intestinal riche en ions métalliques, au milieu interne de l'organisme hôte qui est appauvri en ions métalliques. Les souches ExPEC possèdent de nombreux transporteurs, leur permettant d'acquérir dans les divers environnements, les ions métalliques dont elles ont besoin. Parmi ces transporteurs, ceux du fer ont été fréquemment impliqués dans la virulence des ExPEC. L'importance des transporteurs des autres métaux pour la virulence des ExPEC était beaucoup moins bien caractérisée. Par exemple, rien n'était connu de l'importance du zinc et du manganèse, pourtant très fortement représentés dans le métallome d'*E. coli*.

Nous avons étudié l'impact sur la virulence des ExPEC des transporteurs du fer divalent SitABCD et FeoB, des transporteurs de manganèse SitABCD et MntH, ainsi que des transporteurs de zinc ZnuACB et ZupT. De plus, nous avons aussi étudié l'acquisition des métaux par SitABCD (manganèse et fer), ainsi que ZnuACB et ZupT (zinc). Enfin, nous avons tenté d'identifier chez les souches mutantes à la virulence atténuée, les phénotypes pouvant expliquer leur perte de virulence. Ainsi, étant donné que le fer, le manganèse et le zinc sont reliés à la résistance au stress oxydatif, nous avons vérifié si la perte de ces transporteurs affectait la capacité des souches ExPEC à résister au stress oxydatif. De même, l'homéostasie du zinc chez *E. coli* semblait connectée à la motilité. Nous avons donc vérifié si la perte des transporteurs de zinc affectait la motilité des souches mutantes dérivées d'une souche pathogène urinaire d'*E. coli* (UPEC).

Nos résultats démontrent que les transporteurs de manganèse et de zinc contribuent à la virulence des souches ExPEC. De plus, nos résultats démontrent que les transporteurs les plus importants *in vivo*, sont les transporteurs ABC (*ATP binding cassette*) : SitABCD et ZnuACB. Par contre, les transporteurs dépendants du gradient chimiosmotique : MntH et ZupT, sont d'une moindre importance et FeoABC dépendant de l'hydrolyse du GTP est important seulement dans certaines niches anatomiques. Enfin, nos résultats confirment l'importance de l'acquisition du manganèse et du zinc pour la résistance au stress oxydatif, ainsi que de l'acquisition du zinc pour la motilité.

L'identification des transporteurs ABC de zinc et de manganèse en tant que facteurs importants pour la survie des souches pathogènes *in vivo*, permet d'envisager les transporteurs ABC en tant que cibles thérapeutiques potentielles pour la prévention et le traitement des maladies due aux souches ExPEC et possiblement aux autres bactéries pathogènes.

Ainsi, notre étude affirme l'importance pour la virulence, de l'acquisition des ions métalliques par les bactéries pathogènes et ouvre des perspectives nouvelles dans la lutte contre les infections causées par les pathogènes bactériens.

Annexe 1 : Liste des abréviations utilisées dans le texte.

- ABC :** Cassette de liaison à l'ATP dans l'ATP-ase cytoplasmique des transporteurs de la famille du même nom (perméases ABC). Il s'agit d'un ensemble de motifs conservés dans toutes les ATP-ases de cette famille des transporteurs et nécessaires à leur fonction.
- ADP, ATP :** Adénosine di et tri-phosphate. L'ATP est la forme d'énergie la plus utilisée par la cellule, d'où la désignation de « devise » énergétique cellulaire. L'ADP est en même temps le précurseur de l'ATP lors de la production de l'ATP et le sous-produit de l'hydrolyse de l'ATP.
- ADN :** Acide désoxyribonucléique. Macromolécule de nucléotides polymérisés utilisée en tant que support de l'information génétique.
- APEC :** Souches pathogènes aviaires d'*Escherichia coli*. Caused la colibacillose aviaire, infection respiratoire évoluant vers une septicémie et une infection systémique et pouvant être fatale.
- ARN :** Acide ribonucléique. Polymère de nucléotides utilisés pour la transmission du message génétique (ARN messenger ou ARNm) ou pour adapter les acides aminés au message génétique lors de la traduction en protéines (ARN de transfert ou ARNt).
- ATP-ase** Enzyme hydrolysant l'ATP en ADP avec libération d'énergie.
- Bftn** Bactérioferritine : protéine d'entreposage du fer bactérienne.
- c-di-GMP** deux molécules de guanosine monophosphate associées de façon à créer un « cycle ». Messenger cellulaire important, contrôlant de nombreux phénotypes chez *E. coli*.
- Dps** Protéines de détoxification du fer, protégeant l'ADN contre le stress oxydatif généré lors des réactions de Fenton.
- EHEC** Souches entérohémorragiques pathogènes d'*E. coli*.
- EPEC** Souches entériques pathogènes d'*E. coli*.
- ETEC** Souches entérotoxigènes pathogènes d'*E. coli*
- ExPEC** Souches extra-intestinales pathogènes *E. coli*
- GDP, GTP** Guanosine di et tri-phosphate. Forme d'utilisation de l'énergie chimique par la cellule (voir ATP).

Feo	transporteur de fer ferreux (Fe^{2+}), dépendant de l'hydrolyse du GTP pour l'énergie nécessaire au transport.
Ftn	Ferritine, protéine d'entreposage du fer.
Fur	Répresseur de l'import du fer. Régulateur global de l'homéostasie du fer chez <i>E. coli</i> et d'autres bactéries.
InsA, InsB	Séquences d'insertion d'information génétique, conjointement appelées <i>IS</i> .
Kat	Catalase
MntH	Transporteur de manganèse de la famille Nramp, dépend du gradient des protons pour l'énergie du transport.
MntR	Régulateur du transport du manganèse.
Nramp :	Famille des transporteurs des ions divalents des métaux de transition, surtout du fer et du manganèse. Importants chez les eucaryotes pour l'homéostasie de ces métaux et l'immunité.
OxyR	Régulateur transcriptionnel de la réponse au stress oxydatif, surtout impliqué dans la résistance au H_2O_2 .
PCR	Réaction d'amplification en chaîne de l'ADN par une ADN-polymérase thermostable à haute processivité.
ROI	Radicaux réactifs d'oxygène. Sous-produits toxiques de l'oxygène à l'origine du stress oxydatif.
ppGpp	Alarmonne de la réponse stringente. Important messenger cellulaire dérivé de la guanosine.
Sit	Transporteur ABC de fer et manganèse divalents. Chez <i>E. coli</i> est pathospécifique et présent chez les ExPEC
Sod	Superoxyde-dismutase.
SoxS, SoxR	Régulateur et senseur responsables de la réponse au superoxyde.
Tro	Transporteur homologue à Sit et en même temps à Znu chez <i>Treponema</i> .
UPEC	Souches uropathogènes d' <i>E. coli</i> .
Zip	Famille de transporteurs des métaux de transition divalents, dépendante du gradient chimiosmotique pour l'énergie du transport.
Znu	Transporteur ABC de zinc.
ZntA	Transporteur P-ATP-ase responsable de l'efflux du zinc.

- ZupT** Transporteur Zip d'*E. coli*, second transporteur de zinc chez cette espèce bactérienne.
- Yfe** Transporteur homologue à Sit chez *Yersinia*.

Annexe 2 : Liste des affiches et présentations orales.

- Novembre 2007 Titre : Le transporteur de zinc ZnuABC est important pour la virulence des souches extra-intestinales pathogènes d'*Escherichia coli* (ExPEC).
Auteurs : M. Sabri, J. Proulx, S. Houle, C.M. Dozois.
Lieu : Congrès de l'INRS Institut Armand Frappier, Orford, Québec, Canada.
- Octobre 2007 Titre: Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) O78 strain.
Auteurs: M. Sabri, M. Caza, J. Proulx, M. H. Lymberopoulos, A. Brée, M. Moulin-Schouleur, R. Curtiss III, C. M. Dozois
Lieu : EMBO-FEMS-LEOPOLDINA Symposium, Kloster Bantz, Bad Staffelstein, Allemagne
- Juin 2007 Titre : Importance du transporteur de zinc ZnuABC pour la virulence et la résistance au stress oxydatif des souches d'*Escherichia coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC). **Présentation orale.**
Auteurs : M. Sabri, J. Proulx, S. Houle, CM. Dozois.
Lieu: Symposium du Centre de recherche en infectiologie porcine (CRIP), Faculté de médecine vétérinaire de l'Université de Montréal, St. Hyacinthe, Québec, Canada.
- Juin 2007 Titre: Zinc transporter ZnuABC contributes to extra-intestinal virulence of *Escherichia coli* and resistance to oxidative stress.
Auteurs: M. Sabri, J. Proulx, S. Houle and C.M. Dozois
Lieu: Congrès annuel de la société canadienne des microbiologistes (SCM), Université Laval, Ville de Québec, Québec, Canada.
- Juin 2006 Titre: *Escherichia coli* sitABCD homologue is a manganese and iron transporter important for the virulence of the avian pathogenic strain chi7122.
Auteurs: M. Sabri, M. Caza, S. Léveille, M.H. Lymberopoulos, C.M. Dozois.
Lieu : Congrès annuel de la société canadienne des microbiologistes (SCM), University of Western Ontario, London, Ontario, Canada.

Annexe 3 : Contribution de l'étudiant.

Article 1 (*Microbiology* 2006) : Toutes les expériences, mis à part le criblage de la localisation plasmidique ou chromosomique de l'opéron *SitABCD* et l'obtention du mutant Δsit de la souche APEC $\chi 7122$ (faits par S. Léveillé). Rédaction de la première version du manuscrit.

Article 2 (*Infection and Immunity* 2008) : Toutes les expériences à part le criblage des souches d'*E. coli* pour la présence de l'opéron *SitABCD* (fait par M. Lymberopoulos), classement des souches APEC par virulence (fait par A. Bréc et M. Moulin-Shouleur), monoinfection expérimentale du mutant $\Delta sitABCD$ (fait par M. Caza), stress oxydatif (fait par Julie Proulx), complémentation Δsit (fait par G. Harris), analyse phylogénétique de *SitABCD* (fait par C. Dozois). Rédaction de la première version du manuscrit.

Article 3 (en préparation) : Toutes les expériences, aidé par S. Houle lors des infections urinaires murines. Rédaction de la première version du manuscrit.

Article 4 (*Infection and Immunity* 2006) : Transport des sidérophores marqués à l'isotope radioactif du fer, lectures de la radioactivité par scintillation liquide, analyse de ces résultats et préparation de la première version des figures relatives à ces données. Étant donné ma contribution limitée à cet article je n'ai pas jugé nécessaire de l'inclure avec les autres publications de cette thèse. Je fournis ici le titre et les autres informations pertinentes concernant cette publication.

Titre : Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor.

Auteurs : Léveillé S, Caza M, Johnson JR, Clabots C, Sabri M, Dozois CM.

Revue : Infect Immun. 2006 Jun;74(6):3427-36.

Remerciements :

Un énorme merci !!!

À tous les membres passés et présents de l'équipe Dozois qui ont collaboré à mes projets ou qui m'ont fait l'honneur de me permettre de collaborer aux leurs.

À notre assistant de recherche Sébastien Houle pour son aide lors des infections.

À Charles pour son soutien et son encadrement.

À ma femme Kim pour sa patience et sa capacité stoïque d'écouter mes monologues sur l'importance des systèmes de transport des métaux et les expériences qui parfois fonctionnent (à merveille) et parfois ne fonctionnent pas (pendant des mois).

À mes parents pour les encouragements.

À *E. coli* : un des organismes les plus fonctionnels que cette planète ait porté, qui m'a permis de mieux apprécier à quel point le phénomène du vivant est complexe.

À tous les poulets et toutes les souris qui ont été sacrifiés sur l'autel de la découverte scientifique.

Le mot de la fin.

Il y a quelques années je suis arrivé au laboratoire de Charles. En ce temps-là, je n'étais qu'un étudiant sans grande habileté expérimentale, à peine capable de faire un PCR ou d'obtenir des cellules chimiocompétentes. Notre laboratoire était alors à ses débuts. Les années ont passé, l'étudiant en question et le laboratoire ont tous deux gagné en maturité. La liste des publications et des présentations réalisées par les membres de notre laboratoire s'allonge petit à petit, nos projets scientifiques évoluent.

Je suis le premier étudiant à compléter ses travaux de doctorat dans notre laboratoire. Et c'est avec regret que je me prépare aujourd'hui à tourner la page sur mes projets touchant au métabolisme des ions métalliques divalents chez *E. coli*. En effet, plusieurs questions sont restées sans réponse. Plusieurs hypothèses ont été formulées, mais n'ont pas été démontrées expérimentalement. Plusieurs expériences préliminaires réalisées, mais n'ont pas été publiées et donc n'ont pas été mentionnées dans le présent document.

J'ai confiance que d'autres étudiants continueront à développer ces projets et je leur souhaite bonne chance, mais surtout patience et curiosité. Des étudiants curieux seront intéressés à découvrir, des étudiants patients y arriveront tôt ou tard. Et je vais lire leurs articles avec beaucoup d'intérêt.

Références bibliographiques :

1. Nobeli, I. and J.M. Thornton, *A bioinformatician's view of the metabolome*. *Bioessays*, 2006. **28**(5): p. 534-45.
2. Wackett, L.P., A.G. Dodge, and L.B. Ellis, *Microbial genomics and the periodic table*. *Appl Environ Microbiol*, 2004. **70**(2): p. 647-55.
3. Williams, R.J.P., *Chemical selection of elements by the cell*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2001. **216-217**: p. 583-595.
4. Silva, J.J.R.F.d. and R.J.P. Williams, *The biological chemistry of the elements : the inorganic chemistry of life*. 2nd ed. 2001, Oxford: Oxford University Press. xvii, 575 p.
5. Franzle, S. and B. Markert, *Metals in biomass: from the biological system of elements to reasons of fractionation and element use*. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2007. **14**(6): p. 404-13.
6. Williams, R.J.P., *Chemical selection of elements by cells*. *Coordination Chemistry Reviews*, 2001. **216-217**: p. 583-595.
7. Dupont, C.L., et al., *Modern proteomes contain putative imprints of ancient shifts in trace metal geochemistry*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2006. **103**(47): p. 17822-7.
8. Barton, L.L., et al., *The bacterial metallome: composition and stability with specific reference to the anaerobic bacterium *Desulfovibrio desulfuricans**. *Biometals*, 2007. **20**(3-4): p. 291-302.
9. Haraguchi, H., *Metallomics as integrated biometal science*. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, 2004. **19**(1): p. 5-14.
10. Riordan, J.F. and B.L. Vallee, *The functional roles of metals in metalloenzymes*. *Adv Exp Med Biol*, 1974. **48**(0): p. 33-57.
11. Feinberg, H., H.M. Greenblatt, and G. Shoham, *Structural studies of the role of the active site metal in metalloenzymes*. *J Chem Inf Comput Sci*, 1993. **33**(3): p. 501-16.
12. Giedroc, D.P., et al., *Zinc metalloproteins involved in replication and transcription*. *J Inorg Biochem*, 1986. **28**(2-3): p. 155-69.
13. Braun, V., K. Hantke, and W. Koster, *Bacterial iron transport: mechanisms, genetics, and regulation*. *Met Ions Biol Syst*, 1998. **35**: p. 67-145.
14. Silver, S. and T. Phung le, *A bacterial view of the periodic table: genes and proteins for toxic inorganic ions*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2005. **32**(11-12): p. 587-605.
15. Silver, S., *Bacterial resistances to toxic metal ions--a review*. *Gene*, 1996. **179**(1): p. 9-19.
16. Andrews, S.C., A.K. Robinson, and F. Rodriguez-Quinones, *Bacterial iron homeostasis*. *FEMS Microbiol Rev*, 2003. **27**(2-3): p. 215-37.
17. Choudhury, R.S., S., *Zinc resistance mechanisms in bacteria*. *Current Science*, 2001. **81**(7): p. 768-773.
18. Hantke, K., *Iron and metal regulation in bacteria*. *Curr Opin Microbiol*, 2001. **4**(2): p. 172-7.
19. Rensing, C. and B. Mitra, *Zinc, Cadmium, and Lead Resistance and Homeostasis*, in *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. 2007. p. 321-341.
20. Kehres, D.G. and M.E. Maguire, *Emerging themes in manganese transport, biochemistry and pathogenesis in bacteria*. *FEMS Microbiol Rev*, 2003. **27**(2-3): p. 263-90.
21. Hantke, K., *Bacterial zinc uptake and regulators*. *Curr Opin Microbiol*, 2005. **8**(2): p. 196-202.

22. Outten, C.E. and T.V. O'Halloran, *Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis*. *Science*, 2001. **292**(5526): p. 2488-92.
23. Chiancone, E., et al., *Iron and proteins for iron storage and detoxification*. *Biometals*, 2004. **17**(3): p. 197-202.
24. Giedroc, D.P. and A.I. Arunkumar, *Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches*. *Dalton Trans*, 2007(29): p. 3107-20.
25. Pennella, M.A. and D.P. Giedroc, *Structural determinants of metal selectivity in prokaryotic metal-responsive transcriptional regulators*. *Biometals*, 2005. **18**(4): p. 413-28.
26. Permina, E.A., et al., *Comparative genomics of regulation of heavy metal resistance in Eubacteria*. *BMC Microbiol*, 2006. **6**: p. 49.
27. Masse, E., C.K. Vanderpool, and S. Gottesman, *Effect of RyhB small RNA on global iron use in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2005. **187**(20): p. 6962-71.
28. Silver, S. and L.T. Phung, *Bacterial heavy metal resistance: new surprises*. *Annu Rev Microbiol*, 1996. **50**: p. 753-89.
29. Archibald, F., *Manganese: its acquisition by and function in the lactic acid bacteria*. *Crit Rev Microbiol*, 1986. **13**(1): p. 63-109.
30. Desrosiers, D.C., et al., *The general transition metal (Tro) and Zn²⁺ (Znu) transporters in Treponema pallidum: analysis of metal specificities and expression profiles*. *Mol Microbiol*, 2007. **65**(1): p. 137-52.
31. Papp-Wallace, K.M. and M.E. Maguire, *Manganese transport and the role of manganese in virulence*. *Annu Rev Microbiol*, 2006. **60**: p. 187-209.
32. Finney, L.A. and T.V. O'Halloran, *Transition Metal Speciation in the Cell: Insights from the Chemistry of Metal Ion Receptors*. *Science*, 2003. **300**(5621): p. 931-936.
33. Christianson, D.W., *Structural chemistry and biology of manganese metalloenzymes*. *Prog Biophys Mol Biol*, 1997. **67**(2-3): p. 217-52.
34. Auld, D.S., *Zinc coordination sphere in biochemical zinc sites*. *Biometals*, 2001. **14**(3-4): p. 271-313.
35. Rees, D.C., *Great metaloclusters in enzymology*. *Annu Rev Biochem*, 2002. **71**: p. 221-46.
36. Boll, M., et al., *Novel bacterial molybdenum and tungsten enzymes: three-dimensional structure, spectroscopy, and reaction mechanism*. *Biol Chem*, 2005. **386**(10): p. 999-1006.
37. Maguire, M.E. and J.A. Cowan, *Magnesium chemistry and biochemistry*. *Biometals*, 2002. **15**(3): p. 203-10.
38. MacPherson, I.S. and M.E. Murphy, *Type-2 copper-containing enzymes*. *Cell Mol Life Sci*, 2007. **64**(22): p. 2887-99.
39. Morokuma, K.M., D. G. Vreven, T. Basch, H. Torrent, M. and Khoroshun D. V. , *Model studies of the structures, reactivities, and reaction mechanisms of metalloenzymes*. *IBM Journal of Research and Development*, 2001. **45**(3/4): p. 367-395.
40. Torrent, M., et al., *Effects of the protein environment on the structure and energetics of active sites of metalloenzymes. ONIOM study of methane monooxygenase and ribonucleotide reductase*. *J Am Chem Soc*, 2002. **124**(2): p. 192-3.
41. Christianson, D.W. and J.D. Cox, *Catalysis by metal-activated hydroxide in zinc and manganese metalloenzymes*. *Annu Rev Biochem*, 1999. **68**: p. 33-57.
42. Recalcati, S., et al., *New functions for an iron storage protein: the role of ferritin in immunity and autoimmunity*. *J Autoimmun*, 2008. **30**(1-2): p. 84-9.

43. Ong, S.T., et al., *Iron-withholding strategy in innate immunity*. Immunobiology, 2006. **211**(4): p. 295-314.
44. Liuzzi, J.P., et al., *Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(19): p. 6843-8.
45. Corbin, B.D., et al., *Metal chelation and inhibition of bacterial growth in tissue abscesses*. Science, 2008. **319**(5865): p. 962-5.
46. Russo, T.A. and J.R. Johnson, *Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC*. J Infect Dis, 2000. **181**(5): p. 1753-4.
47. Johnson, J.R. and T.A. Russo, *Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) Escherichia coli*. Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7): p. 383-404.
48. Johnson, J.R. and T.A. Russo, *Extraintestinal pathogenic Escherichia coli: "the other bad E coli"*. J Lab Clin Med, 2002. **139**(3): p. 155-62.
49. Dho-Moulin, M. and J.M. Fairbrother, *Avian pathogenic Escherichia coli (APEC)*. Vet Res, 1999. **30**(2-3): p. 299-316.
50. Russo, T.A. and J.R. Johnson, *Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem*. Microbes Infect, 2003. **5**(5): p. 449-56.
51. Segal, A.W., *How neutrophils kill microbes*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 197-223.
52. Krishnakumar, R., et al., *Differences in enzymatic properties allow SodCI but not SodCII to contribute to virulence in Salmonella enterica serovar Typhimurium strain I4028*. J Bacteriol, 2004. **186**(16): p. 5230-8.
53. Hopkin, K.A., M.A. Papazian, and H.M. Steinman, *Functional differences between manganese and iron superoxide dismutases in Escherichia coli K-12*. J Biol Chem, 1992. **267**(34): p. 24253-8.
54. Runyen-Janecky, L.J., et al., *Contribution of the Shigella flexneri Sit, Iuc, and Feo iron acquisition systems to iron acquisition in vitro and in cultured cells*. Infect Immun, 2003. **71**(4): p. 1919-28.
55. Ammendola, S., et al., *High-affinity Zn²⁺ uptake system ZnuABC is required for bacterial zinc homeostasis in intracellular environments and contributes to the virulence of Salmonella enterica*. Infect Immun, 2007. **75**(12): p. 5867-76.
56. Boyer, E., et al., *Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Infect Immun, 2002. **70**(11): p. 6032-42.
57. Campoy, S., et al., *Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in Salmonella enterica serovar typhimurium virulence*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4721-5.
58. Janakiraman, A. and J.M. Slauch, *The putative iron transport system SitABCD encoded on SPII is required for full virulence of Salmonella typhimurium*. Mol Microbiol, 2000. **35**(5): p. 1146-55.
59. Bearden, S.W. and R.D. Perry, *The Yfe system of Yersinia pestis transports iron and manganese and is required for full virulence of plague*. Mol Microbiol, 1999. **32**(2): p. 403-14.
60. Kehres, D.G., et al., *Regulation of Salmonella enterica serovar Typhimurium mntH transcription by H₂O₂, Fe(2+), and Mn(2+)*. J Bacteriol, 2002. **184**(12): p. 3151-8.
61. Perry, R.D., et al., *Regulation of the Yersinia pestis Yfe and Ybt iron transport systems*. Adv Exp Med Biol, 2003. **529**: p. 275-83.
62. Runyen-Janecky, L., et al., *Role and regulation of the Shigella flexneri sit and MntH systems*. Infect Immun, 2006. **74**(8): p. 4666-72.

63. Claverys, J.P., *A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases*. Res Microbiol, 2001. **152**(3-4): p. 231-43.
64. Cartron, M.L., et al., *Feo--transport of ferrous iron into bacteria*. Biometals, 2006. **19**(2): p. 143-57.
65. Yatsunyk, L.A., et al., *Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from Escherichia coli*. J Biol Inorg Chem, 2008. **13**(2): p. 271-88.
66. Bergey, D.H. and J.G. Holt, *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9th ed. 1994, Baltimore: Williams & Wilkins. xviii, 787 p.
67. Prescott, L.M., J.P. Harley, and D.A. Klein, *Microbiology*. 6th ed. 2005, Dubuque, IA: McGraw-Hill Higher Education. 1 v. (various pagings).
68. Ohnishi, M., K. Kurokawa, and T. Hayashi, *Diversification of Escherichia coli genomes: are bacteriophages the major contributors?* Trends Microbiol, 2001. **9**(10): p. 481-5.
69. Dutta, C. and A. Pan, *Horizontal gene transfer and bacterial diversity*. J Biosci, 2002. **27**(1 Suppl 1): p. 27-33.
70. Elena, S.F., et al., *Genomic divergence of Escherichia coli strains: evidence for horizontal transfer and variation in mutation rates*. Int Microbiol, 2005. **8**(4): p. 271-8.
71. Welch, R.A., et al., *Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(26): p. 17020-4.
72. Robins-Browne, R.M., et al., *Adherence characteristics of attaching and effacing strains of Escherichia coli from rabbits*. Infect Immun, 1994. **62**(5): p. 1584-92.
73. Dziva, F. and M.P. Stevens, *Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic Escherichia coli in their natural hosts*. Avian Pathol, 2008. **37**(4): p. 355-66.
74. Dozois, C.M. and R. Curtiss, 3rd, *Pathogenic diversity of Escherichia coli and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream*. Vet Res, 1999. **30**(2-3): p. 157-79.
75. Kaper, J.B., J.P. Nataro, and H.L. Mobley, *Pathogenic Escherichia coli*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(2): p. 123-40.
76. Hochhut, B., U. Dobrindt, and J. Hacker, *Pathogenicity islands and their role in bacterial virulence and survival*. Contrib Microbiol, 2005. **12**: p. 234-54.
77. Sabri, M., S. Leveille, and C.M. Dozois, *A SitABCD homologue from an avian pathogenic Escherichia coli strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide*. Microbiology, 2006. **152**(Pt 3): p. 745-58.
78. Dozois, C.M., et al., *Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian Escherichia coli and localization and analysis of the Tsh genetic region*. Infect Immun, 2000. **68**(7): p. 4145-54.
79. Caza, M., et al., *Specific roles of the iroBCDEN genes for the virulence of an avian pathogenic Escherichia coli (APEC) O78 strain and for the production of salmochelins*. Infect Immun, 2008.
80. Sakellaris, H., et al., *Regulated site-specific recombination of the she pathogenicity island of Shigella flexneri*. Mol Microbiol, 2004. **52**(5): p. 1329-36.
81. *EcoSal Escherichia coli and Salmonella : cellular and molecular biology*. 2002, ASM Press: Washington, D.C.
82. Mokady, D., U. Gophna, and E.Z. Ron, *Virulence factors of septicemic Escherichia coli strains*. Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7): p. 455-62.
83. Emody, L., M. Kerenyi, and G. Nagy, *Virulence factors of uropathogenic Escherichia coli*. Int J Antimicrob Agents, 2003. **22 Suppl 2**: p. 29-33.

84. Law, D., *Virulence factors of enteropathogenic Escherichia coli*. J Med Microbiol, 1988. **26**(1): p. 1-10.
85. Le Bouguenec, C., *Adhesins and invasins of pathogenic Escherichia coli*. Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7): p. 471-8.
86. Lamarche, M.G., et al., *The phosphate regulon and bacterial virulence: a regulatory network connecting phosphate homeostasis and pathogenesis*. FEMS Microbiol Rev, 2008. **32**(3): p. 461-73.
87. Mellata, M., et al., *Role of avian pathogenic Escherichia coli virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 494-503.
88. Mellata, M., et al., *Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic Escherichia coli to serum and in pathogenicity*. Infect Immun, 2003. **71**(1): p. 536-40.
89. Storz, G. and J.A. Imlay, *Oxidative stress*. Curr Opin Microbiol, 1999. **2**(2): p. 188-94.
90. Touati, D., *Iron and oxidative stress in bacteria*. Arch Biochem Biophys, 2000. **373**(1): p. 1-6.
91. Steinman, H.M., L. Weinstein, and M. Brenowitz, *The manganese superoxide dismutase of Escherichia coli K-12 associates with DNA*. J Biol Chem, 1994. **269**(46): p. 28629-34.
92. Kim, Y.H., et al., *The role of periplasmic antioxidant enzymes (superoxide dismutase and thiol peroxidase) of the Shiga toxin-producing Escherichia coli O157:H7 in the formation of biofilms*. Proteomics, 2006. **6**(23): p. 6181-93.
93. Keyer, K., A.S. Gort, and J.A. Imlay, *Superoxide and the production of oxidative DNA damage*. J Bacteriol, 1995. **177**(23): p. 6782-90.
94. Gort, A.S. and J.A. Imlay, *Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses*. J Bacteriol, 1998. **180**(6): p. 1402-10.
95. Krishnakumar, R., et al., *Structural properties of periplasmic SodCI that correlate with virulence in Salmonella enterica serovar Typhimurium*. J Bacteriol, 2007. **189**(12): p. 4343-52.
96. Berg, J.M. and Y. Shi, *The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc*. Science, 1996. **271**(5252): p. 1081-5.
97. Christianson, D.W., *Structural biology of zinc*. Adv Protein Chem, 1991. **42**: p. 281-355.
98. Andreini, C., et al., *Zinc through the three domains of life*. J Proteome Res, 2006. **5**(11): p. 3173-8.
99. Vallee, B.L. and D.S. Auld, *Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins*. Biochemistry, 1990. **29**(24): p. 5647-59.
100. Vallee, B.L. and D.S. Auld, *Active-site zinc ligands and activated H₂O of zinc enzymes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(1): p. 220-4.
101. Vallee, B.L., *Zinc: biochemistry, physiology, toxicology and clinical pathology*. Biofactors, 1988. **1**(1): p. 31-6.
102. Springgate, C.F., et al., *Escherichia coli deoxyribonucleic acid polymerase I, a zinc metalloenzyme. Nuclear quadrupolar relaxation studies of the role of bound zinc*. J Biol Chem, 1973. **248**(17): p. 5987-93.
103. Giedroc, D.P. and J.E. Coleman, *Structural and functional differences between the two intrinsic zinc ions of Escherichia coli RNA polymerase*. Biochemistry, 1986. **25**(17): p. 4969-78.
104. Akanuma, G., et al., *Liberation of zinc-containing L31 (RpmE) from ribosomes by its paralogous gene product, YtiA, in Bacillus subtilis*. J Bacteriol, 2006. **188**(7): p. 2715-20.

105. Panina, E.M., A.A. Mironov, and M.S. Gelfand, *Comparative genomics of bacterial zinc regulons: enhanced ion transport, pathogenesis, and rearrangement of ribosomal proteins*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(17): p. 9912-7.
106. Struhl, K., *Helix-turn-helix, zinc-finger, and leucine-zipper motifs for eukaryotic transcriptional regulatory proteins*. Trends Biochem Sci, 1989. **14**(4): p. 137-40.
107. Sekler, I., et al., *Mechanism and regulation of cellular zinc transport*. Mol Med, 2007. **13**(7-8): p. 337-43.
108. Andreini, C., et al., *Counting the zinc-proteins encoded in the human genome*. J Proteome Res, 2006. **5**(1): p. 196-201.
109. Rink, L. and H. Haase, *Zinc homeostasis and immunity*. Trends Immunol, 2007. **28**(1): p. 1-4.
110. Prasad, A.S., *Role of zinc in human health*. Bol Asoc Med P R, 1991. **83**(12): p. 558-60.
111. Prasad, A.S., *Zinc: mechanisms of host defense*. J Nutr, 2007. **137**(5): p. 1345-9.
112. Haase, H. and L. Rink, *Signal transduction in monocytes: the role of zinc ions*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 579-85.
113. Mariani, E., et al., *Effect of zinc supplementation on plasma IL-6 and MCP-1 production and NK cell function in healthy elderly: Interactive influence of +647 MT1a and -174 IL-6 polymorphic alleles*. Experimental Gerontology. **In press corrected proof**.
114. Mocchegiani, E., et al., *Zinc, Metallothioneins, and Longevity:: Effect of Zinc Supplementation: Zincage Study*. Ann NY Acad Sci, 2007. **1119**(1): p. 129-146.
115. Van Ho, A., D.M. Ward, and J. Kaplan, *TRANSITION METAL TRANSPORT IN YEAST*. Annual Review of Microbiology, 2002. **56**(1): p. 237-261.
116. Kambe, T., et al., *Overview of mammalian zinc transporters*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 2004. **61**(1): p. 49-68.
117. Agte, V.V. and R.V. Nagmote, *Study of factors affecting binding of zinc with albumin at physiological zinc concentrations*. Biofactors, 2004. **20**(3): p. 139-45.
118. Stewart, A.J., et al., *Interdomain zinc site on human albumin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(7): p. 3701-6.
119. Charlwood, P.A., *The relative affinity of transferrin and albumin for zinc*. Biochim Biophys Acta, 1979. **581**(2): p. 260-5.
120. Rowe, D.J. and D.J. Bobilya, *Albumin facilitates zinc acquisition by endothelial cells*. Proc Soc Exp Biol Med, 2000. **224**(3): p. 178-86.
121. Tibaduiza, E.C. and D.J. Bobilya, *Zinc transport across an endothelium includes vesicular cotransport with albumin*. J Cell Physiol, 1996. **167**(3): p. 539-47.
122. Folin, M., E. Contiero, and G.M. Vaselli, *Zinc content of normal human serum and its correlation with some hematic parameters*. Biometals, 1994. **7**(1): p. 75-9.
123. Liuzzi, J.P. and R.J. Cousins, *Mammalian zinc transporters*. Annu Rev Nutr, 2004. **24**: p. 151-72.
124. Montanini, B., et al., *Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity*. BMC Genomics, 2007. **8**: p. 107.
125. Haney, C.J., et al., *New developments in the understanding of the cation diffusion facilitator family*. J Ind Microbiol Biotechnol, 2005. **32**(6): p. 215-26.
126. Guerinot, M.L., *The ZIP family of metal transporters*. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes, 2000. **1465**(1-2): p. 190-198.
127. Kambe, T., et al., *Sequence Similarity and Functional Relationship Among Eukaryotic ZIP and CDF Transporters*. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 2006. **4**(1): p. 1-9.

128. Eide, D., *The SLC39 family of metal ion transporters*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 2004. **447**(5): p. 796-800.
129. Wang, F., et al., *Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter*. Hum Mol Genet, 2004. **13**(5): p. 563-71.
130. Palmiter, R.D. and L. Huang, *Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers*. Pflügers Arch, 2004. **447**(5): p. 744-51.
131. Laity, J.H. and G.K. Andrews, *Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metal-response element binding transcription factor-1 (MTF-1)*. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2007. **463**(2): p. 201-210.
132. Giedroc, D.P., X. Chen, and J.L. Apuy, *Metal response element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1): structure, function, and regulation*. Antioxid Redox Signal, 2001. **3**(4): p. 577-96.
133. Wang, Y., et al., *Metal-responsive transcription factor-1 (MTF-1) selects different types of metal response elements at low vs. high zinc concentration*. Biol Chem, 2004. **385**(7): p. 623-32.
134. Langmade, S.J., et al., *The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene*. J Biol Chem, 2000. **275**(44): p. 34803-9.
135. Andrews, G.K., *Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions*. Biochemical Pharmacology, 2000. **59**(1): p. 95-104.
136. Prasad, A.S., *Zinc and immunity*. Mol Cell Biochem, 1998. **188**(1-2): p. 63-9.
137. Mocchegiani, E., et al., *Zinc-bound metallothioneins and immune plasticity: lessons from very old mice and humans*. Immun Ageing, 2007. **4**: p. 7.
138. Kitamura, H., et al., *Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 971-7.
139. Kroncke, K.D., *Cellular stress and intracellular zinc dyshomeostasis*. Arch Biochem Biophys, 2007. **463**(2): p. 183-7.
140. Formigari, A., P. Irato, and A. Santon, *Zinc, antioxidant systems and metallothionein in metal mediated-apoptosis: biochemical and cytochemical aspects*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2007. **146**(4): p. 443-59.
141. Oteiza, P.I. and G.G. Mackenzie, *Zinc, oxidant-triggered cell signaling, and human health*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(4-5): p. 245-55.
142. Ilbert, M., P.C. Graf, and U. Jakob, *Zinc center as redox switch--new function for an old motif*. Antioxid Redox Signal, 2006. **8**(5-6): p. 835-46.
143. Zago, M.P., S.V. Verstraeten, and P.I. Oteiza, *Zinc in the prevention of Fe²⁺-initiated lipid and protein oxidation*. Biol Res, 2000. **33**(2): p. 143-50.
144. Wong, H.R., et al., *Genome-level expression profiles in pediatric septic shock indicate a role for altered zinc homeostasis in poor outcome*. Physiol Genomics, 2007. **30**(2): p. 146-55.
145. Shanley, T.P., et al., *Genome-level longitudinal expression of signaling pathways and gene networks in pediatric septic shock*. Mol Med, 2007.
146. Wang, M., et al., *Human peptidoglycan recognition proteins require zinc to kill both gram-positive and gram-negative bacteria and are synergistic with antibacterial peptides*. J Immunol, 2007. **178**(5): p. 3116-25.
147. Dziarski, R. and D. Gupta, *Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins*. Cell Microbiol, 2006. **8**(7): p. 1059-69.

148. Blencowe, D.K. and A.P. Morby, *Zn(II) metabolism in prokaryotes*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): p. 291-311.
149. Natori, Y., et al., *A fail-safe system for the ribosome under zinc-limiting conditions in Bacillus subtilis*. Mol Microbiol, 2007. **63**(1): p. 294-307.
150. Higham, D.P., P.J. Sadler, and M.D. Scawen, *Cadmium-binding proteins in Pseudomonas putida: pseudothioneins*. Environ Health Perspect, 1986. **65**: p. 5-11.
151. Blindauer, C.A. and P.J. Sadler, *How to hide zinc in a small protein*. Acc Chem Res, 2005. **38**(1): p. 62-9.
152. Blindauer, C.A., et al., *Multiple bacteria encode metallothioneins and SmtA-like zinc fingers*. Mol Microbiol, 2002. **45**(5): p. 1421-32.
153. Vallee, B.L. and D.S. Auld, *Active zinc binding sites of zinc metalloenzymes*. Matrix Suppl, 1992. **1**: p. 5-19.
154. Sigdel, T.K., J.A. Easton, and M.W. Crowder, *Transcriptional response of Escherichia coli to TPEN*. J Bacteriol, 2006. **188**(18): p. 6709-13.
155. Lee, L.J., J.A. Barrett, and R.K. Poole, *Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured Escherichia coli to zinc*. J Bacteriol, 2005. **187**(3): p. 1124-34.
156. Brocklehurst, K.R. and A.P. Morby, *Metal-ion tolerance in Escherichia coli: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology*. Microbiology, 2000. **146** (Pt 9): p. 2277-82.
157. Sigdel, T.K., et al., *Probing the adaptive response of Escherichia coli to extracellular Zn(II)*. Biometals, 2006. **19**(5): p. 461-71.
158. Easton, J.A., P. Thompson, and M.W. Crowder, *Time-dependent translational response of E. coli to excess Zn(II)*. J Biomol Tech, 2006. **17**(5): p. 303-7.
159. Yamamoto, K. and A. Ishihama, *Transcriptional response of Escherichia coli to external zinc*. J Bacteriol, 2005. **187**(18): p. 6333-40.
160. Kershaw, C.J., N.L. Brown, and J.L. Hobman, *Zinc dependence of zinT (yodA) mutants and binding of zinc, cadmium and mercury by ZinT*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **364**(1): p. 66-71.
161. Nanamiya, H., et al., *Zinc is a key factor in controlling alternation of two types of L31 protein in the Bacillus subtilis ribosome*. Mol Microbiol, 2004. **52**(1): p. 273-83.
162. D'Autreaux, B., et al., *Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the Escherichia coli fur protein*. Biochemistry, 2007. **46**(5): p. 1329-42.
163. Groisman, E.A., *The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ*. J Bacteriol, 2001. **183**(6): p. 1835-42.
164. Zwir, I., et al., *Dissecting the PhoP regulatory network of Escherichia coli and Salmonella enterica*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(8): p. 2862-7.
165. Groisman, E.A. and C. Mouslim, *Sensing by bacterial regulatory systems in host and non-host environments*. Nat Rev Microbiol, 2006. **4**(9): p. 705-9.
166. Bader, M.W., et al., *Recognition of antimicrobial peptides by a bacterial sensor kinase*. Cell, 2005. **122**(3): p. 461-72.
167. Zago, M.P. and P.I. Oteiza, *The antioxidant properties of zinc: interactions with iron and antioxidants*. Free Radic Biol Med, 2001. **31**(2): p. 266-74.
168. Liu, X. and P. Matsumura, *The FlhD/FlhC complex, a transcriptional activator of the Escherichia coli flagellar class II operons*. J Bacteriol, 1994. **176**(23): p. 7345-51.
169. Eguchi, Y., et al., *Signal transduction cascade between EvgA/EvgS and PhoP/PhoQ two-component systems of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2004. **186**(10): p. 3006-14.

170. Cousins, R.J., J.P. Liuzzi, and L.A. Lichten, *Mammalian zinc transport, trafficking, and signals*. J Biol Chem, 2006. **281**(34): p. 24085-9.
171. Nies, D.H. and S. Silver, *Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances*. J Ind Microbiol, 1995. **14**(2): p. 186-99.
172. Leevy, W.M., et al., *Selective recognition of bacterial membranes by zinc(II)-coordination complexes*. Chem Commun (Camb), 2006(15): p. 1595-7.
173. Patzer, S.I. and K. Hantke, *The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1998. **28**(6): p. 1199-210.
174. David, G., et al., *YodA from Escherichia coli is a metal-binding, lipocalin-like protein*. J Biol Chem, 2003. **278**(44): p. 43728-35.
175. Berducci, G., et al., *Periplasmic competition for zinc uptake between the metallochaperone ZnuA and Cu,Zn superoxide dismutase*. FEBS Lett, 2004. **569**(1-3): p. 289-92.
176. Banerjee, S., et al., *Structural determinants of metal specificity in the zinc transport protein ZnuA from synechocystis 6803*. J Mol Biol, 2003. **333**(5): p. 1061-9.
177. Wei, B., et al., *Possible regulatory role for the histidine-rich loop in the zinc transport protein, ZnuA*. Biochemistry, 2007. **46**(30): p. 8734-43.
178. Li, H. and G. Jogl, *Crystal structure of the zinc-binding transport protein ZnuA from Escherichia coli reveals an unexpected variation in metal coordination*. J Mol Biol, 2007. **368**(5): p. 1358-66.
179. Chandra, B.R., M. Yogavel, and A. Sharma, *Structural analysis of ABC-family periplasmic zinc binding protein provides new insights into mechanism of ligand uptake and release*. J Mol Biol, 2007. **367**(4): p. 970-82.
180. Hazlett, K.R., et al., *The Treponema pallidum tro operon encodes a multiple metal transporter, a zinc-dependent transcriptional repressor, and a semi-autonomously expressed phosphoglycerate mutase*. J Biol Chem, 2003. **278**(23): p. 20687-94.
181. Hvorup, R.N., et al., *Asymmetry in the structure of the ABC transporter-binding protein complex BtuCD-BtuF*. Science, 2007. **317**(5843): p. 1387-90.
182. Linton, K.J., *Structure and Function of ABC Transporters*. Physiology, 2007. **22**(2): p. 122-130.
183. Jones, P.M. and A.M. George, *The ABC transporter structure and mechanism: perspectives on recent research*. Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS), 2004. **61**(6): p. 682-699.
184. Locher, K.P., A.T. Lee, and D.C. Rees, *The E. coli BtuCD structure: a framework for ABC transporter architecture and mechanism*. Science, 2002. **296**(5570): p. 1091-8.
185. Patzer, S.I. and K. Hantke, *The zinc-responsive regulator Zur and its control of the znu gene cluster encoding the ZnuABC zinc uptake system in Escherichia coli*. J Biol Chem, 2000. **275**(32): p. 24321-32.
186. Outten, C.E., et al., *Characterization of the metal receptor sites in Escherichia coli Zur, an ultrasensitive zinc(II) metalloregulatory protein*. Biochemistry, 2001. **40**(35): p. 10417-23.
187. Grass, G., et al., *ZupT is a Zn(II) uptake system in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2002. **184**(3): p. 864-6.
188. Grass, G., et al., *The metal permease ZupT from Escherichia coli is a transporter with a broad substrate spectrum*. J Bacteriol, 2005. **187**(5): p. 1604-11.
189. Beard, S.J., et al., *Zinc(II) tolerance in Escherichia coli K-12: evidence that the zntA gene (o732) encodes a cation transport ATPase*. Mol Microbiol, 1997. **25**(5): p. 883-91.

190. Grass, G., et al., *ZitB (YbgR), a member of the cation diffusion facilitator family, is an additional zinc transporter in Escherichia coli*. J Bacteriol, 2001. **183**(15): p. 4664-7.
191. Wei, Y. and D. Fu, *Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the Escherichia coli metal transporter YiiP*. J Biol Chem, 2006. **281**(33): p. 23492-502.
192. Franke, S., et al., *Molecular analysis of the copper-transporting efflux system CusCFBA of Escherichia coli*. J Bacteriol, 2003. **185**(13): p. 3804-12.
193. Liu, J., et al., *Metal-binding affinity of the transmembrane site in ZntA: implications for metal selectivity*. Biochemistry, 2006. **45**(3): p. 763-72.
194. Brown, N.L., et al., *The MerR family of transcriptional regulators*. FEMS Microbiol Rev, 2003. **27**(2-3): p. 145-63.
195. Brocklehurst, K.R., et al., *ZntR is a Zn(II)-responsive MerR-like transcriptional regulator of zntA in Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1999. **31**(3): p. 893-902.
196. Outten, C.E., F.W. Outten, and T.V. O'Halloran, *DNA distortion mechanism for transcriptional activation by ZntR, a Zn(II)-responsive MerR homologue in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1999. **274**(53): p. 37517-24.
197. Garrido, M.E., et al., *The high-affinity zinc-uptake system znuACB is under control of the iron-uptake regulator (fur) gene in the animal pathogen Pasteurella multocida*. FEMS Microbiol Lett, 2003. **221**(1): p. 31-7.
198. Kim, S., et al., *Zinc uptake system (znuA locus) of Brucella abortus is essential for intracellular survival and virulence in mice*. J Vet Med Sci, 2004. **66**(9): p. 1059-63.
199. Lewis, D.A., et al., *Identification of the znuA-encoded periplasmic zinc transport protein of Haemophilus ducreyi*. Infect Immun, 1999. **67**(10): p. 5060-8.
200. Yang, X., et al., *Deletion of znuA virulence factor attenuates Brucella abortus and confers protection against wild-type challenge*. Infect Immun, 2006. **74**(7): p. 3874-9.
201. Aisen, P., C. Enns, and M. Wessling-Resnick, *Chemistry and biology of eukaryotic iron metabolism*. Int J Biochem Cell Biol, 2001. **33**(10): p. 940-59.
202. Andrews, N.C. and P.J. Schmidt, *Iron Homeostasis*. Annual Review of Physiology, 2007. **69**(1): p. 69-85.
203. Borregaard, N. and J.B. Cowland, *Neutrophil gelatinase-associated lipocalin, a siderophore-binding eukaryotic protein*. Biometals, 2006. **19**(2): p. 211-5.
204. Cellier, M.F., et al., *Polyphyletic origins of bacterial Nramp transporters*. Trends Genet, 2001. **17**(7): p. 365-70.
205. Cellier, M.F., P. Courville, and C. Champion, *Nramp1 phagocyte intracellular metal withdrawal defense*. Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1662-70.
206. Makui, H., et al., *Identification of the Escherichia coli K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter*. Mol Microbiol, 2000. **35**(5): p. 1065-78.
207. Kehres, D.G., et al., *The NRAMP proteins of Salmonella typhimurium and Escherichia coli are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen*. Mol Microbiol, 2000. **36**(5): p. 1085-100.
208. Liuzzi, J.P., et al., *Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(37): p. 13612-7.
209. McKie, A.T. and D.J. Barlow, *The SLC40 basolateral iron transporter family (IREG1/ferroportin/MTP1)*. Pflugers Arch, 2004. **447**(5): p. 801-6.
210. Krause, A., et al., *LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity*. FEBS Lett, 2000. **480**(2-3): p. 147-50.
211. Krause, A., et al., *Isolation and biochemical characterization of LEAP-2, a novel blood peptide expressed in the liver*. Protein Sci, 2003. **12**(1): p. 143-52.

212. Ganz, T., *Hepcidin--a peptide hormone at the interface of innate immunity and iron metabolism*. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. **306**: p. 183-98.
213. Nemeth, E. and T. Ganz, *Regulation of iron metabolism by hepcidin*. *Annu Rev Nutr*, 2006. **26**: p. 323-42.
214. Lall, H., K. Coughlan, and V.V. Sumbayev, *HIF-1alpha protein is an essential factor for protection of myeloid cells against LPS-induced depletion of ATP and apoptosis that supports Toll-like receptor 4-mediated production of IL-6*. *Mol Immunol*, 2008.
215. Mi, Z., et al., *Synergistic induction of HIF-1alpha transcriptional activity by hypoxia and lipopolysaccharide in macrophages*. *Cell Cycle*, 2008. **7**(2): p. 232-41.
216. Constante, M., et al., *Distinct requirements for Hfe in basal and induced hepcidin levels in iron overload and inflammation*. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2006. **291**(2): p. G229-37.
217. Yang, F., et al., *Haptoglobin in lung defence*. *Redox Rep*, 2001. **6**(6): p. 372-4.
218. Grass, G., *Iron transport in Escherichia coli: all has not been said and done*. *Biometals*, 2006. **19**(2): p. 159-72.
219. Raymond, K.N., E.A. Dertz, and S.S. Kim, *Enterobactin: an archetype for microbial iron transport*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(7): p. 3584-8.
220. Neilands, J.B., *Mechanism and regulation of synthesis of aerobactin in Escherichia coli K12 (pColV-K30)*. *Can J Microbiol*, 1992. **38**(7): p. 728-33.
221. Crosa, J.H. and C.T. Walsh, *Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2002. **66**(2): p. 223-49.
222. Carniel, E., *The Yersinia high-pathogenicity island: an iron-uptake island*. *Microbes Infect*, 2001. **3**(7): p. 561-9.
223. Bister, B., et al., *The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of Salmonella enterica*. *Biometals*, 2004. **17**(4): p. 471-81.
224. Valdebenito, M., S.I. Muller, and K. Hantke, *Special conditions allow binding of the siderophore salmochelin to siderocalin (NGAL-lipocalin)*. *FEMS Microbiol Lett*, 2007. **277**(2): p. 182-7.
225. Dozois, C.M., F. Daigle, and R. Curtiss, 3rd, *Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic Escherichia coli strain*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(1): p. 247-52.
226. Wagegg, W. and V. Braun, *Ferric citrate transport in Escherichia coli requires outer membrane receptor protein fecA*. *J Bacteriol*, 1981. **145**(1): p. 156-63.
227. Hantke, K., *Dihydroxybenzoylserine--a siderophore for E. coli*. *FEMS Microbiol Lett*, 1990. **55**(1-2): p. 5-8.
228. Leveille, S., et al., *Iha from an Escherichia coli urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor*. *Infect Immun*, 2006. **74**(6): p. 3427-36.
229. Russo, T.A., U.B. Carlino, and J.R. Johnson, *Identification of a new iron-regulated virulence gene, ireA, in an extraintestinal pathogenic isolate of Escherichia coli*. *Infect Immun*, 2001. **69**(10): p. 6209-16.
230. Kammler, M., C. Schon, and K. Hantke, *Characterization of the ferrous iron uptake system of Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 1993. **175**(19): p. 6212-9.
231. Marlovits, T.C., et al., *The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(25): p. 16243-8.

232. Hantke, K., *Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil?* Trends Microbiol, 2003. **11**(5): p. 192-5.
233. Stojiljkovic, I., M. Cobeljic, and K. Hantke, *Escherichia coli K-12 ferrous iron uptake mutants are impaired in their ability to colonize the mouse intestine.* FEMS Microbiol Lett, 1993. **108**(1): p. 111-5.
234. Sabri, M., et al., *Contribution of the SitABCD, MntH, and FeoB metal transporters to the virulence of avian pathogenic Escherichia coli O78 strain chi7122.* Infect Immun, 2008. **76**(2): p. 601-11.
235. Zhou, D., W.D. Hardt, and J.E. Galan, *Salmonella typhimurium encodes a putative iron transport system within the centisome 63 pathogenicity island.* Infect Immun, 1999. **67**(4): p. 1974-81.
236. Kehres, D.G., et al., *SitABCD is the alkaline Mn(2+) transporter of Salmonella enterica serovar Typhimurium.* J Bacteriol, 2002. **184**(12): p. 3159-66.
237. Torres, A.G. and S.M. Payne, *Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic Escherichia coli O157:H7.* Mol Microbiol, 1997. **23**(4): p. 825-33.
238. Otto, B.R., et al., *Characterization of a hemoglobin protease secreted by the pathogenic Escherichia coli strain EB1.* J Exp Med, 1998. **188**(6): p. 1091-1103.
239. Drago-Serrano, M.E., S.G. Parra, and H.A. Manjarrez-Hernandez, *EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic Escherichia coli (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin.* FEMS Microbiol Lett, 2006. **265**(1): p. 35-40.
240. Grosse, C., et al., *A new ferrous iron-uptake transporter, EfeU (YcdN), from Escherichia coli.* Mol Microbiol, 2006. **62**(1): p. 120-31.
241. Cao, J., et al., *EfeUOB (YcdNOB) is a tripartite, acid-induced and CpxAR-regulated, low-pH Fe²⁺ transporter that is cryptic in Escherichia coli K-12 but functional in E. coli O157:H7.* Mol Microbiol, 2007. **65**(4): p. 857-75.
242. Abdul-Tehrani, H., et al., *Ferritin mutants of Escherichia coli are iron deficient and growth impaired, and fur mutants are iron deficient.* J Bacteriol, 1999. **181**(5): p. 1415-28.
243. McHugh, J.P., et al., *Global iron-dependent gene regulation in Escherichia coli. A new mechanism for iron homeostasis.* J Biol Chem, 2003. **278**(32): p. 29478-86.
244. Jacques, J.F., et al., *RyhB small RNA modulates the free intracellular iron pool and is essential for normal growth during iron limitation in Escherichia coli.* Mol Microbiol, 2006. **62**(4): p. 1181-90.
245. Murphy, E.R. and S.M. Payne, *RyhB, an iron-responsive small RNA molecule, regulates Shigella dysenteriae virulence.* Infect Immun, 2007. **75**(7): p. 3470-7.
246. Oglesby, A.G., et al., *Fur regulates acid resistance in Shigella flexneri via RyhB and ydeP.* Mol Microbiol, 2005. **58**(5): p. 1354-67.
247. Vecerek, B., I. Moll, and U. Blasi, *Control of Fur synthesis by the non-coding RNA RyhB and iron-responsive decoding.* EMBO J, 2007. **26**(4): p. 965-75.
248. Touati, D., et al., *Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta fur mutants of Escherichia coli: protective role of superoxide dismutase.* J Bacteriol, 1995. **177**(9): p. 2305-14.
249. Varghese, S., et al., *Submicromolar hydrogen peroxide disrupts the ability of Fur protein to control free-iron levels in Escherichia coli.* Mol Microbiol, 2007. **64**(3): p. 822-30.
250. Andrews, S.C., *Iron storage in bacteria.* Adv Microb Physiol, 1998. **40**: p. 281-351.
251. Grass, G., et al., *FieF (YiiP) from Escherichia coli mediates decreased cellular accumulation of iron and relieves iron stress.* Arch Microbiol, 2005. **183**(1): p. 9-18.

252. Jung, I.L. and I.G. Kim, *Transcription of ahpC, katG, and katE genes in Escherichia coli is regulated by polyamines: polyamine-deficient mutant sensitive to H2O2-induced oxidative damage*. Biochem Biophys Res Commun, 2003. **301**(4): p. 915-22.
253. Cabisco, E., J. Tamarit, and J. Ros, *Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species*. Int Microbiol, 2000. **3**(1): p. 3-8.
254. Hoffmann, J.H., et al., *Identification of a redox-regulated chaperone network*. EMBO J, 2004. **23**(1): p. 160-8.
255. Ilbert, M., et al., *The redox-switch domain of Hsp33 functions as dual stress sensor*. Nat Struct Mol Biol, 2007. **14**(6): p. 556-63.
256. Braun, V., *Bacterial iron transport related to virulence*. Contrib Microbiol, 2005. **12**: p. 210-33.
257. Jakubovics, N.S. and H.F. Jenkinson, *Out of the iron age: new insights into the critical role of manganese homeostasis in bacteria*. Microbiology, 2001. **147**(Pt 7): p. 1709-18.
258. de Lorenzo, V. and J.L. Martinez, *Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 1988. **7**(5): p. 621-9.
259. Lawlor, M.S., C. O'Connor, and V.L. Miller, *Yersiniabactin is a virulence factor for Klebsiella pneumoniae during pulmonary infection*. Infect Immun, 2007. **75**(3): p. 1463-72.
260. Crouch, M.L., et al., *Biosynthesis and IroC-dependent export of the siderophore salmochelin are essential for virulence of Salmonella enterica serovar Typhimurium*. Mol Microbiol, 2008. **67**(5): p. 971-83.
261. Torres, A.G., et al., *TonB-dependent systems of uropathogenic Escherichia coli: aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6179-85.
262. Hancock, V., L. Ferrieres, and P. Klemm, *The ferric yersiniabactin uptake receptor FyuA is required for efficient biofilm formation by urinary tract infectious Escherichia coli in human urine*. Microbiology, 2008. **154**(Pt 1): p. 167-75.
263. Velayudhan, J., et al., *Iron acquisition and virulence in Helicobacter pylori: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter*. Mol Microbiol, 2000. **37**(2): p. 274-86.
264. Hagan, E.C. and H.L. Mobley, *Uropathogenic Escherichia coli outer membrane antigens expressed during urinary tract infection*. Infect Immun, 2007. **75**(8): p. 3941-9.
265. Segal, A.W., *How superoxide production by neutrophil leukocytes kills microbes*. Novartis Found Symp, 2006. **279**: p. 92-8; discussion 98-100, 216-9.
266. Green, J.N., C.C. Winterbourn, and M.B. Hampton, *Analysis of neutrophil bactericidal activity*. Methods Mol Biol, 2007. **412**: p. 319-32.
267. Roth, J.A., *Homeostatic and toxic mechanisms regulating manganese uptake, retention, and elimination*. Biol Res, 2006. **39**(1): p. 45-57.
268. Aschner, J.L. and M. Aschner, *Nutritional aspects of manganese homeostasis*. Mol Aspects Med, 2005. **26**(4-5): p. 353-62.
269. He, L., et al., *ZIP8, member of the solute-carrier-39 (SLC39) metal-transporter family: characterization of transporter properties*. Mol Pharmacol, 2006. **70**(1): p. 171-80.
270. Girijashanker, K., et al., *Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter*. Mol Pharmacol, 2008. **73**(5): p. 1413-23.
271. Kobayashi, K., et al., *Induction of metallothionein by manganese is completely dependent on interleukin-6 production*. J Pharmacol Exp Ther, 2007. **320**(2): p. 721-7.
272. Arita, Y., et al., *Antioxidants improve antibacterial function in hyperoxia-exposed macrophages*. Free Radic Biol Med, 2007. **42**(10): p. 1517-23.

273. Dernbach, E., et al., *Antioxidative stress-associated genes in circulating progenitor cells: evidence for enhanced resistance against oxidative stress*. *Blood*, 2004. **104**(12): p. 3591-7.
274. Jain, V., M. Kumar, and D. Chatterji, *ppGpp: stringent response and survival*. *J Microbiol*, 2006. **44**(1): p. 1-10.
275. Romling, U., M. Gomelsky, and M.Y. Galperin, *C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system*. *Mol Microbiol*, 2005. **57**(3): p. 629-39.
276. Cotter, P.A. and S. Stibitz, *c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation*. *Curr Opin Microbiol*, 2007. **10**(1): p. 17-23.
277. Zaharik, M.L. and B.B. Finlay, *Mn²⁺ and bacterial pathogenesis*. *Front Biosci*, 2004. **9**: p. 1035-42.
278. Courville, P., R. Chaloupka, and M.F. Cellier, *Recent progress in structure-function analyses of Nramp proton-dependent metal-ion transporters*. *Biochem Cell Biol*, 2006. **84**(6): p. 960-78.
279. Perry, R.D., I. Mier, Jr., and J.D. Fetherston, *Roles of the Yfe and Feo transporters of Yersinia pestis in iron uptake and intracellular growth*. *Biometals*, 2007. **20**(3-4): p. 699-703.
280. Golynskiy, M.V., et al., *Metal binding studies and EPR spectroscopy of the manganese transport regulator MntR*. *Biochemistry*, 2006. **45**(51): p. 15359-72.
281. Guedon, E. and J.D. Helmann, *Origins of metal ion selectivity in the DtxR/MntR family of metalloregulators*. *Mol Microbiol*, 2003. **48**(2): p. 495-506.
282. Golynskiy, M.V., et al., *Metal-induced structural organization and stabilization of the metalloregulatory protein MntR*. *Biochemistry*, 2005. **44**(9): p. 3380-9.
283. Golynskiy, M., et al., *Conformational studies of the manganese transport regulator (MntR) from Bacillus subtilis using deuterium exchange mass spectrometry*. *J Biol Inorg Chem*, 2007. **12**(5): p. 699-709.
284. Patzer, S.I. and K. Hantke, *Dual repression by Fe(2+)-Fur and Mn(2+)-MntR of the mntH gene, encoding an NRAMP-like Mn(2+) transporter in Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 2001. **183**(16): p. 4806-13.
285. Hamed, M.Y., *Binding of the ferric uptake regulation repressor protein (Fur) to Mn(II), Fe(II), Co(II), and Cu(II) ions as co-repressors: electronic absorption, equilibrium, and 57Fe Mossbauer studies*. *J Inorg Biochem*, 1993. **50**(3): p. 193-210.
286. Platero, R., et al., *Sinorhizobium meliloti fur-like (Mur) protein binds a fur box-like sequence present in the mntA promoter in a manganese-responsive manner*. *Appl Environ Microbiol*, 2007. **73**(15): p. 4832-8.
287. Hassan, H.M. and L.W. Schrum, *Roles of manganese and iron in the regulation of the biosynthesis of manganese-superoxide dismutase in Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, 1994. **14**(4): p. 315-23.
288. Jang, S. and J.A. Imlay, *Micromolar intracellular hydrogen peroxide disrupts metabolism by damaging iron-sulfur enzymes*. *J Biol Chem*, 2007. **282**(2): p. 929-37.
289. Imlay, J.A., *Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen*. *Mol Microbiol*, 2006. **59**(4): p. 1073-82.
290. Keyer, K. and J.A. Imlay, *Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(24): p. 13635-40.
291. Park, S. and J.A. Imlay, *High levels of intracellular cysteine promote oxidative DNA damage by driving the fenton reaction*. *J Bacteriol*, 2003. **185**(6): p. 1942-50.

292. Munroe, W., et al., *Only one of a wide assortment of manganese-containing SOD mimicking compounds rescues the slow aerobic growth phenotypes of both Escherichia coli and Saccharomyces cerevisiae strains lacking superoxide dismutase enzymes.* J Inorg Biochem, 2007. **101**(11-12): p. 1875-82.
293. Tseng, H.J., et al., *Accumulation of manganese in Neisseria gonorrhoeae correlates with resistance to oxidative killing by superoxide anion and is independent of superoxide dismutase activity.* Mol Microbiol, 2001. **40**(5): p. 1175-86.
294. Janulczyk, R., S. Ricci, and L. Bjorck, *MtsABC is important for manganese and iron transport, oxidative stress resistance, and virulence of Streptococcus pyogenes.* Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2656-64.
295. Marra, A., et al., *In vivo characterization of the psa genes from Streptococcus pneumoniae in multiple models of infection.* Microbiology, 2002. **148**(Pt 5): p. 1483-91.
296. Gat, O., et al., *The solute-binding component of a putative Mn(II) ABC transporter (MntA) is a novel Bacillus anthracis virulence determinant.* Mol Microbiol, 2005. **58**(2): p. 533-51.
297. Zaharik, M.L., et al., *The Salmonella enterica serovar typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model.* Infect Immun, 2004. **72**(9): p. 5522-5.
298. Linton, K.J. and C.F. Higgins, *The Escherichia coli ATP-binding cassette (ABC) proteins.* Mol Microbiol, 1998. **28**(1): p. 5-13.
299. Davidson, A.L. and P.C. Maloney, *ABC transporters: how small machines do a big job.* Trends Microbiol, 2007. **15**(10): p. 448-55.
300. Nataro, J.P. and J.B. Kaper, *Diarrheagenic Escherichia coli.* Clin Microbiol Rev, 1998. **11**(1): p. 142-201.
301. Gyles, C.L., *Escherichia coli in domestic animals and humans.* 1994, Wallingford, England CAB International, 1994. xv, 666.
302. La Ragione, R.M. and M.J. Woodward, *Virulence factors of Escherichia coli serotypes associated with avian colisepticaemia.* Res Vet Sci, 2002. **73**(1): p. 27-35.
303. Brown, P.K. and R. Curtiss, 3rd, *Unique chromosomal regions associated with virulence of an avian pathogenic Escherichia coli strain.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(20): p. 11149-54.
304. Imlay, J., *Pathways of oxidative damage.* Ann. Rev. Microbiol., 2003. **57**: p. 395-418.
305. Zheng, M., et al., *OxyR and SoxRS regulation of fur.* J Bacteriol, 1999. **181**(15): p. 4639-43.
306. Tardat, B. and D. Touati, *Iron and oxygen regulation of Escherichia coli MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcaA for binding to DNA.* Mol Microbiol, 1993. **9**(1): p. 53-63.
307. Horsburgh, M.J., et al., *Manganese: elemental defence for a life with oxygen.* Trends Microbiol, 2002. **10**(11): p. 496-501.
308. Bearden, S.W., T.M. Staggs, and R.D. Perry, *An ABC transporter system of Yersinia pestis allows utilization of chelated iron by Escherichia coli SAB11.* J Bacteriol, 1998. **180**(5): p. 1135-47.
309. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning: a laboratory manual.* 3rd Ed. ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
310. Kado, C.I. and S.T. Liu, *Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids.* J Bacteriol, 1981. **145**(3): p. 1365-73.

311. Coulange, F., et al., *Isolation of genomic fragments specific for avian pathogenic Escherichia coli (APEC)*. Amer. Soc. for Microbiol. 100th General Meeting, 2000. **Abstract B-64**: p. 55.
312. Schouler, C., et al., *Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic Escherichia coli strain of O2 serogroup*. Microbiology-Sgm, 2004. **150**: p. 2973-2984.
313. Wei, J., et al., *Complete genome sequence and comparative genomics of Shigella flexneri serotype 2a strain 2457T*. Infect Immun, 2003. **71**(5): p. 2775-86.
314. Jin, Q., et al., *Genome sequence of Shigella flexneri 2a: insights into pathogenicity through comparison with genomes of Escherichia coli K12 and O157*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(20): p. 4432-41.
315. Datsenko, K.A. and B.L. Wanner, *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(12): p. 6640-5.
316. Nag, D.K., H.V. Huang, and D.E. Berg, *Bidirectional chain-termination nucleotide sequencing: transposon Tn5seq1 as a mobile source of primer sites*. Gene, 1988. **64**(1): p. 135-45.
317. Rice, P., I. Longden, and A. Bleasby, *EMBOSS: The European molecular biology open software suite*. Trends in Genetics, 2000. **16**(6): p. 276-277.
318. Schwyn, B. and J.B. Neilands, *Universal chemical assay for the detection and determination of siderophores*. Anal Biochem, 1987. **160**(1): p. 47-56.
319. Gong, S., et al., *Characterization of the Yersinia pestis Yfu ABC inorganic iron transport system*. Infect Immun, 2001. **69**(5): p. 2829-37.
320. Silver, S. and M.L. Kralovic, *Manganese accumulation by Escherichia coli: evidence for a specific transport system*. Biochem Biophys Res Commun, 1969. **34**(5): p. 640-5.
321. Vokes, S.A., et al., *The aerobactin iron transport system genes in Shigella flexneri are present within a pathogenicity island*. Mol Microbiol, 1999. **33**(1): p. 63-73.
322. Moss, J.E., et al., *The selC-associated SHI-2 pathogenicity island of Shigella flexneri*. Mol Microbiol, 1999. **33**(1): p. 74-83.
323. de Lorenzo, V., et al., *Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor*. J Bacteriol, 1987. **169**(6): p. 2624-30.
324. Sorsa, L.J., et al., *Characterization of an iroBCDEN gene cluster on a transmissible plasmid of uropathogenic Escherichia coli: evidence for horizontal transfer of a chromosomal virulence factor*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3285-93.
325. Waters, V.L. and J.H. Crosa, *Colicin V virulence plasmids*. Microbiol Rev, 1991. **55**(3): p. 437-50.
326. Warner, P.J., et al., *ColV plasmid-specific aerobactin synthesis by invasive strains of Escherichia coli*. Infect Immun, 1981. **33**(2): p. 540-5.
327. Valvano, M.A. and J.H. Crosa, *Aerobactin iron transport genes commonly encoded by certain ColV plasmids occur in the chromosome of a human invasive strain of Escherichia coli K1*. Infect Immun, 1984. **46**(1): p. 159-67.
328. Dobrindt, U., et al., *S-Fimbria-encoding determinant sfa(I) is located on pathogenicity island III(536) of uropathogenic Escherichia coli strain 536*. Infect Immun, 2001. **69**(7): p. 4248-56.
329. Runyen-Janecky, L.J. and S.M. Payne, *Identification of chromosomal Shigella flexneri genes induced by the eukaryotic intracellular environment*. Infect Immun, 2002. **70**(8): p. 4379-88.

330. Mobley, H.L., et al., *Pyelonephritogenic Escherichia coli and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains*. Infect Immun, 1990. **58**(5): p. 1281-9.
331. Provence, D.L. and R. Curtiss, 3rd, *Role of *crl* in avian pathogenic Escherichia coli: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production*. Infect Immun, 1992. **60**(11): p. 4460-7.
332. Daskaleros, P.A., J.A. Stoeber, and S.M. Payne, *Iron uptake in Plesiomonas shigelloides: cloning of the genes for the heme-iron uptake system*. Infect Immun, 1991. **59**(8): p. 2706-11.
333. Bindereif, A. and J.B. Neilands, *Cloning of the aerobactin-mediated iron assimilation system of plasmid ColV*. J Bacteriol, 1983. **153**(2): p. 1111-3.
334. Chang, A.C. and S.N. Cohen, *Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from the P15A cryptic miniplasmid*. J Bacteriol, 1978. **134**(3): p. 1141-56.
335. Gilson, L., H.K. Mahanty, and R. Kolter, *Four plasmid genes are required for colicin V synthesis, export, and immunity*. J Bacteriol, 1987. **169**(6): p. 2466-70.
336. Wang, R.F. and S.R. Kushner, *Construction of versatile low-copy-number vectors for cloning, sequencing and gene expression in Escherichia coli*. Gene, 1991. **100**: p. 195-9.
337. Brzuszkiewicz, E., et al., *How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic Escherichia coli strains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(34): p. 12879-84.
338. Chen, S.L., et al., *Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of Escherichia coli: a comparative genomics approach*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(15): p. 5977-82.
339. Rodriguez-Siek, K.E., et al., *Comparison of Escherichia coli isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 6): p. 2097-110.
340. Schouler, C., et al., *Genomic subtraction for the identification of putative new virulence factors of an avian pathogenic Escherichia coli strain of O2 serogroup*. Microbiology, 2004. **150**(Pt 9): p. 2973-84.
341. Johnson, T.J., et al., *The genome sequence of avian pathogenic Escherichia coli strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic E. coli genomes*. J Bacteriol, 2007. **189**(8): p. 3228-36.
342. Johnson, T.J., S.J. Johnson, and L.K. Nolan, *Complete DNA sequence of a ColBM plasmid from avian pathogenic Escherichia coli suggests that it evolved from closely related ColV virulence plasmids*. J Bacteriol, 2006. **188**(16): p. 5975-83.
343. Liu, M., et al., *Construction, detection and microarray analysis on the Shigella flexneri 2a sitC mutant*. Sci China C Life Sci, 2005. **48**(3): p. 228-40.
344. Li, G., et al., *Identification of genes required for avian Escherichia coli septicemia by signature-tagged mutagenesis*. Infect Immun, 2005. **73**(5): p. 2818-27.
345. Herzer, P.J., et al., *Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of Escherichia coli*. J Bacteriol, 1990. **172**(11): p. 6175-81.
346. Clermont, O., S. Bonacorsi, and E. Bingen, *Rapid and simple determination of the Escherichia coli phylogenetic group*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10): p. 4555-8.
347. Sambrook, J. and D.W. Russell, *Molecular cloning : a laboratory manual*. 3rd ed. 2001, Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 3 v.

348. Hanahan, D., J. Jessee, and F.R. Bloom, *Techniques for transformation of E. coli*, in *DNA cloning I: Core techniques*, D.M. Glover and B.D. Hames, Editors. 1995, Oxford Univ. Press: New York, NY. p. 1-35.
349. Chaudhuri, R.R., A.M. Khan, and M.J. Pallen, *coliBASE: an online database for Escherichia coli, Shigella and Salmonella comparative genomics*. *Nucleic Acids Res*, 2004. **32**(Database issue): p. D296-9.
350. Restieri, C., et al., *Autotransporter encoding sequences are phylogenetically distributed among Escherichia coli clinical isolates and reference strains*. *Appl Environ Microbiol*, 2007.
351. Baba, T., et al., *Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection*. *Mol Syst Biol*, 2006. **2**: p. 2006 0008.
352. Lamarche, M.G., et al., *Inactivation of the pst system reduces the virulence of an avian pathogenic Escherichia coli O78 strain*. *Infect Immun*, 2005. **73**(7): p. 4138-45.
353. Kumar, S., K. Tamura, and M. Nei, *MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment*. *Brief Bioinform*, 2004. **5**(2): p. 150-63.
354. Saitou, N. and M. Nei, *The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees*. *Mol Biol Evol*, 1987. **4**(4): p. 406-25.
355. Jukes, T.H. and C.R. Cantor, *Evolution of protein molecules.*, in *Mammalian Protein Metabolism*, H.N. Munro, Editor. 1969, Academic Press: New York. p. 21-132.
356. Mehta, P., S. Casjens, and S. Krishnaswamy, *Analysis of the lambdoid prophage element e14 in the E. coli K-12 genome*. *BMC Microbiol*, 2004. **4**: p. 4.
357. Casjens, S., *Prophages and bacterial genomics: what have we learned so far?* *Mol Microbiol*, 2003. **49**(2): p. 277-300.
358. Richer, E., et al., *Horizontal gene transfer of "prototype" Nramp in bacteria*. *J Mol Evol*, 2003. **57**(4): p. 363-76.
359. Rodriguez-Siek, K.E., et al., *Characterizing the APEC pathotype*. *Vet Res*, 2005. **36**(2): p. 241-56.
360. Ewers, C., et al., *Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing Escherichia coli: how closely related are they?* *Int J Med Microbiol*, 2007. **297**(3): p. 163-76.
361. Johnson, T.J., et al., *DNA sequence of a ColV plasmid and prevalence of selected plasmid-encoded virulence genes among avian Escherichia coli strains*. *J Bacteriol*, 2006. **188**(2): p. 745-58.
362. Snyder, J.A., et al., *Transcriptome of uropathogenic Escherichia coli during urinary tract infection*. *Infect Immun*, 2004. **72**(11): p. 6373-81.
363. Lucchini, S., et al., *Transcriptional adaptation of Shigella flexneri during infection of macrophages and epithelial cells: insights into the strategies of a cytosolic bacterial pathogen*. *Infect Immun*, 2005. **73**(1): p. 88-102.
364. Roos, V., et al., *The asymptomatic bacteriuria Escherichia coli strain 83972 outcompetes uropathogenic E. coli strains in human urine*. *Infect Immun*, 2006. **74**(1): p. 615-24.
365. Carlioz, A. and D. Touati, *Isolation of superoxide dismutase mutants in Escherichia coli: is superoxide dismutase necessary for aerobic life?* *Embo J*, 1986. **5**(3): p. 623-30.
366. Hassan, H.M. and I. Fridovich, *Intracellular production of superoxide radical and of hydrogen peroxide by redox active compounds*. *Arch Biochem Biophys*, 1979. **196**(2): p. 385-95.

367. Schwartz, C.E., et al., *Catalase and superoxide dismutase in Escherichia coli*. J Biol Chem, 1983. **258**(10): p. 6277-81.
368. Ginns, C.A., et al., *Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian Escherichia coli requires carriage of a conjugative plasmid*. Infect Immun, 2000. **68**(3): p. 1535-41.
369. Ike, K., et al., *Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian Escherichia coli mediated by conjugative 100-megadalton plasmid*. J Vet Med Sci, 1992. **54**(6): p. 1091-8.
370. Tivendale, K.A., et al., *Association of iss and iucA, but not tsh, with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic Escherichia coli*. Infect Immun, 2004. **72**(11): p. 6554-60.
371. Smith, H.W., *A search for transmissible pathogenic characters in invasive strains of Escherichia coli: the discovery of a plasmid-controlled toxin and a plasmid-controlled lethal character closely associated, or identical, with colicine V*. J Gen Microbiol, 1974. **83**(0): p. 95-111.
372. Skyberg, J.A., et al., *Acquisition of avian pathogenic Escherichia coli plasmids by a commensal E. coli isolate enhances its abilities to kill chicken embryos, grow in human urine, and colonize the murine kidney*. Infect Immun, 2006. **74**(11): p. 6287-92.
373. Lymberopoulos, M.H., et al., *Characterization of Stg fimbriae from an avian pathogenic Escherichia coli O78:K80 strain and assessment of their contribution to colonization of the chicken respiratory tract*. J Bacteriol, 2006. **188**(18): p. 6449-59.
374. Miller, V.L., R.K. Taylor, and J.J. Mekalanos, *Cholera toxin transcriptional activator toxR is a transmembrane DNA binding protein*. Cell, 1987. **48**(2): p. 271-9.
375. McClelland, M., et al., *Complete genome sequence of Salmonella enterica serovar Typhimurium LT2*. Nature, 2001. **413**(6858): p. 852-6.
376. Dobrindt, U., *(Patho-)Genomics of Escherichia coli*. Int J Med Microbiol, 2005. **295**(6-7): p. 357-71.
377. Marrs, C.F., L. Zhang, and B. Foxman, *Escherichia coli mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic E. coli (UPEC) pathotypes?* FEMS Microbiol Lett, 2005. **252**(2): p. 183-90.
378. Hentze, M.W., M.U. Muckenthaler, and N.C. Andrews, *Balancing acts: molecular control of mammalian iron metabolism*. Cell, 2004. **117**(3): p. 285-97.
379. Nelson, N., *Metal ion transporters and homeostasis*. EMBO J, 1999. **18**(16): p. 4361-71.
380. Eide, D.J., *Zinc transporters and the cellular trafficking of zinc*. Biochim Biophys Acta, 2006. **1763**(7): p. 711-22.
381. Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann, *Iron and microbial infection*. Nat Rev Microbiol, 2004. **2**(12): p. 946-53.
382. Wally, J. and S.K. Buchanan, *A structural comparison of human serum transferrin and human lactoferrin*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 249-62.
383. Fischbach, M.A., et al., *The pathogen-associated iroA gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(44): p. 16502-7.
384. Sohnle, P.G., et al., *Zinc-reversible antimicrobial activity of recombinant calprotectin (migration inhibitory factor-related proteins 8 and 14)*. J Infect Dis, 2000. **182**(4): p. 1272-5.
385. Lusitani, D., S.E. Malawista, and R.R. Montgomery, *Calprotectin, an abundant cytosolic protein from human polymorphonuclear leukocytes, inhibits the growth of Borrelia burgdorferi*. Infect Immun, 2003. **71**(8): p. 4711-6.
386. Schaible, U.E. and S.H. Kaufmann, *A nutritive view on the host-pathogen interplay*. Trends Microbiol, 2005. **13**(8): p. 373-80.

387. Lane, M.C., et al., *Role of motility in the colonization of uropathogenic Escherichia coli in the urinary tract*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7644-56.
388. King, J.C., D.M. Shames, and L.R. Woodhouse, *Zinc Homeostasis in Humans*. J. Nutr., 2000. **130**(5): p. 1360S-1366.
389. Anderson, G.G., S.M. Martin, and S.J. Hultgren, *Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract*. Microbes Infect, 2004. **6**(12): p. 1094-101.
390. Gort, A.S., D.M. Ferber, and J.A. Imlay, *The regulation and role of the periplasmic copper, zinc superoxide dismutase of Escherichia coli*. Mol Microbiol, 1999. **32**(1): p. 179-91.
391. Ammendola, S., et al., *Regulatory and structural differences in the Cu,Zn-superoxide dismutases of Salmonella enterica and their significance for virulence*. J Biol Chem, 2008. **283**(20): p. 13688-99.
392. Althaus, E.W., et al., *The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein*. Biochemistry, 1999. **38**(20): p. 6559-69.
393. Wang, S., et al., *Structure of the Escherichia coli FlhDC complex, a prokaryotic heteromeric regulator of transcription*. J Mol Biol, 2006. **355**(4): p. 798-808.
394. Wright, K.J., P.C. Seed, and S.J. Hultgren, *Uropathogenic Escherichia coli flagella aid in efficient urinary tract colonization*. Infect Immun, 2005. **73**(11): p. 7657-68.
395. Blattner, F.R., et al., *The complete genome sequence of Escherichia coli K-12*. Science, 1997. **277**(5331): p. 1453-74.
396. Miller, V.L. and J.J. Mekalanos, *A novel suicide vector and its use in construction of insertion mutations: osmoregulation of outer membrane proteins and virulence determinants in Vibrio cholerae requires toxR*. J Bacteriol, 1988. **170**(6): p. 2575-83.
397. Kwon, S.J., et al., *A high-throughput screen for porphyrin metal chelatases: application to the directed evolution of ferrochelatases for metalloporphyrin biosynthesis*. Chembiochem, 2004. **5**(8): p. 1069-74.
398. Chanana, V., et al., *Coordinated expression and immunogenicity of an outer membrane protein from Salmonella enterica serovar Typhi under iron limitation, oxidative stress and anaerobic conditions*. J Biomed Sci, 2006. **13**(3): p. 303-12.