

INRS-Institut Armand-Frappier

**Inhibition de l'adhérence des *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux par l'utilisation de composés mannosylés**

Par  
Julie Séguin

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

Jury d'évaluation

Président du jury et examineur interne	Claude Dupont INRS – Institut Armand-Frappier
Examineur externe	Marc Sirois Département de chimie-biologie Université du Québec à Trois-Rivières
Directeur de recherche	Charles M. Dozois INRS – Institut Armand-Frappier



## Résumé

Les ExPEC (*Escherichia coli* pathogènes extra-intestinaux) causent des infections systémiques chez l'humain, la volaille et d'autres espèces. Les fimbriae de type 1 représentent l'un des principaux facteurs de virulence communs aux ExPEC. Cette structure de surface filamenteuse reconnaît et adhère à des récepteurs mannosylés retrouvés dans une multitude d'organes dont la vessie. Cette interaction est très souvent essentielle à la colonisation, étape critique de l'initiation de l'infection dans la plupart des pathologies causées par des ExPEC. Empêcher cette interaction grâce à un compétiteur du récepteur pourrait être une excellente alternative aux antibiotiques dans la prévention et le traitement des infections causées par les ExPEC. L'équipe de chimistes du professeur René Roy de l'UQAM a donc mis au point la synthèse de plusieurs molécules multimériques ramifiées, appelées glycodendrimères, qui comportent différents nombres d'unités mannosylées. L'objectif de cette étude est donc d'évaluer la capacité de ces différents glycodendrimères mannosylés à inhiber l'adhérence par les fimbriae de type 1 dans différents contextes.

Pour arriver à ces fins, des mutants de trois souches ExPEC (CFT073, ECOL72, UCB34) négatifs pour les fimbriae de type 1 ou leur adhésine FimH ont été générés afin de servir de contrôles au cours des différents tests. Les trois mutants ont été testés en co-infections contre les souches virulentes correspondantes dans le modèle d'infection du tractus urinaire murin afin de confirmer l'importance des fimbriae de type 1 dans la colonisation par ces souches. La capacité d'inhibition de l'adhérence de 16 glycodendrimères a par la suite été évaluée par des tests d'agglutination de levures en microplaques de 96 puits. Des tests d'adhérence sur des cellules T24 et HeLa en culture ont été effectués, mais beaucoup de problèmes rencontrés lors de la mise au point de la technique en ont fait un échec. Comme alternative, des tests d'adhérence sur des coupes congelées de tissus aviaire et murin ont été menés. Finalement, la capacité d'inhibition de l'adhérence d'un seul glycodendrimère a été évaluée *in vivo* dans un modèle murin.

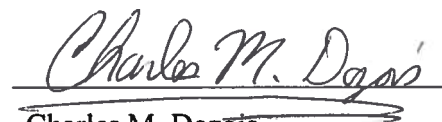
Les trois mutants déficients pour les fimbriae de type 1 ont moins colonisé les vessies murines que les souches sauvages et deux des trois mutants ont démontré une colonisation réduite des reins. Plusieurs glycodendrimères ont été de 500 à 2000 fois plus

efficaces que le méthyl-mannose pour inhiber l'agglutination de levures par les ExPEC. L'absence d'agglutination par les mutants  $\Delta fim$  et  $\Delta fimH$  a confirmé le rôle des fimbriae de type 1 dans l'agglutination des levures. Les glycodendrimères ont aussi permis une forte inhibition de l'adhérence des ExPEC sur les coupes congelées de tissus. Malheureusement, le glycodendrimère évalué *in vivo* n'a pas eu de succès au niveau de la réduction ou de l'élimination de la charge bactérienne dans les organes du tractus urinaire des souris.

Comme les infections démontrent l'importance du fimbriae de type 1 dans la colonisation par trois souches ExPEC phylogénétiquement distinctes et que plusieurs des glycodendrimères démontrent une forte capacité d'inhibition de l'adhérence par le fimbriae de type 1 *in vivo* ainsi que *ex vivo*, il est possible de croire à un potentiel thérapeutiques pour quelques unes de ces molécules. Bien sûr, beaucoup d'autres aspects devront être considérés avant que nous voyons l'apparition d'une de ces molécules sur les tablettes de nos pharmacies.



Julie Séguin  
Étudiante



Charles M. Dozois  
Directeur de recherche

## Remerciements

Je voudrais d'abord remercier mon directeur de recherche, docteur Charles M. Dozois, qui a accepté de m'accueillir dans son laboratoire, me permettant ainsi d'effectuer des études graduées enrichissantes. Il a su me guider et me supporter lors de mes travaux de recherche, ce qui m'a permis de me rendre au bout de cette maîtrise et ainsi d'acquérir d'incalculables connaissances variées et beaucoup d'expérience. Merci aussi de m'avoir donné l'occasion d'assister et surtout de participer à plusieurs congrès dont un congrès d'envergure internationale.

J'aimerais ensuite remercier tous les gens qui sont ou ont été membres du laboratoire de Charles M. Dozois durant mon passage, particulièrement l'agent de recherche Sébastien Houle pour son aide surtout technique, ainsi que Julie Proulx et Mélissa Caza pour m'avoir si bien intégrée à l'équipe.

Je voudrais remercier notre collaborateur, le professeur René Roy, du département de chimie de l'Université du Québec à Montréal ainsi que toute son équipe mais plus spécifiquement Mohamed Touaibia et Chichi Shiao pour leur coopération et leur disponibilité, pour avoir répondu à toutes mes questions et pour leur support technique lorsqu'il était question de chimie.

J'aimerais de plus remercier la Fondation Armand-Frappier ainsi que le Centre de Recherche PharmaQAM pour les bourses d'études que ces organismes m'ont accordées et qui m'ont permis de mettre à terme mon projet de maîtrise.

Je tiens aussi à remercier mes parents pour leurs encouragements et pour tout le support qu'ils m'ont apporté de tous les moyens qu'ils ont pu et qui m'a beaucoup aidé à passer au travers de mes études. Merci aussi à mes deux sœurs que j'adore, Marie-Ève et Michèle, qui sont toujours là pour moi et sans qui je n'aurais pu me rendre où je suis aujourd'hui. Je voudrais finalement remercier tout spécialement mon copain Jonathan qui m'a supportée au quotidien dans les bons et surtout dans les nombreux durs moments. Il a su, à maintes reprises, me remonter le moral lors des pires découragements, me redonner ma motivation lorsque je l'avais perdue et être patient et compréhensif lorsque je l'étais moins. Merci d'avoir été là pour moi!

## Liste des figures

Figure 1.1	Pathogénèse de l'infection ascendante du tractus urinaire.....	13
Figure 1.2	Image d'une CBI colorée par immunohistochimie. ....	14
Figure 1.3	Représentation des facteurs de virulence présents chez les ExPEC.....	21
Figure 1.4	Organisation génétique et représentations du fimbriae de type 1.....	34
Figure 1.5	Assemblage du fimbriae de type 1.....	35
Figure 1.6	Le phénomène du « cross-talk » entre les fimbriae. ....	40
Figure 1.7	Les deux types de thérapie anti-adhérence utilisant des analogues. ....	55
Figure 1.8	Différents types de glycodendrimères. ....	57
Figure 2.1	Organisation génétique du plasmide pDM915.....	63
Figure 2.2	Étapes de la technique de mutation par échange allélique. ....	65
Figure 2.3	Inhibiteurs monomériques. ....	73
Figure 2.4	Inhibiteurs avec un cœur composé de pentaérythritols.....	74
Figure 2.5	Inhibiteurs avec un cœur composé de cyclotriphosphazène. ....	76
Figure 3.1	Co-infections démontrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation. ....	90
Figure 3.2	Inhibition d'agglutination de levures par des molécules mannosylées. ..	91
Figure 3.3	Tests d'adhérence de CFT073 sur coupes congelées de vessies murines.	94
Figure 3.4	Tests d'adhérence de $\chi$ 7122 sur coupes congelées de trachées aviaires..	95
Figure 3.5	Tests d'adhérence sur coupes congelées de poumons aviaires.....	96
Figure 3.6	Infections de souris avec CFT073 en présence et en absence de DM125.	97

## Liste des tableaux

Tableau 1.1	Les différents pathotypes de <i>Escherichia coli</i> .....	7
Tableau 1.2	Adhésines d'importance selon les différents pathotypes ExPEC. ....	32
Tableau 2.1	Caractéristiques des inhibiteurs d'adhérence. ....	72
Tableau 3.1	Comptes viables et ratios des inocula de départ.....	88
Tableau 3.2	Contamination des cavités péritonéales de souris .....	89

## Liste des abréviations

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>APEC</b>	« Avian pathogenic <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> pathogène aviaire
<b>BAS</b>	Bactériurie asymptomatique significative
<b>BHE</b>	Barrière hématoencéphalique
<b>BSG</b>	« Buffered saline with gelatin » Tampon salin avec gélatine
<b>CAM</b>	Complexe d'attaque membranaire
<b>CBI</b>	Communauté bactérienne intracellulaire
<b>CEACAM</b>	« Carcinoembryonic antigen related cell adhesion molecule » Molécule d'adhésion cellulaire reliée à l'antigène carcino-embryonnaire
<b>CMI</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>CNF1</b>	« Cytotoxic necrotizing factor 1 » Facteur cytotoxique nécrosant type 1
<b>DAEC</b>	« Diffusely adherent <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> à adhérence diffuse
<b>DAF</b>	« Decay accelerating factor » Facteur accélérateur de la dissociation
<b>dATP</b>	Désoxy adénine triphosphate
<b>dCTP</b>	Désoxy cytosine triphosphate
<b>dGTP</b>	Désoxy guanine triphosphate
<b>dNTP</b>	Mélange des quatre désoxyribonucléotides dATP, dCTP, dGTP et dTTP.
<b>dTTP</b>	Désoxy thymine triphosphate
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EAEC</b>	« Enteroaggregative <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> entéroagrégatif
<b>ECOR</b>	« <i>Escherichia coli</i> reference collection » Collection de référence d' <i>Escherichia coli</i>

<b>EDTA</b>	Acide éthylènediaminetétraacétique
<b>EHEC</b>	« Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> entérohémorragique
<b>EI</b>	Élément inversible
<b>EIEC</b>	« Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> entéroinvasif
<b>EPEC</b>	« Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> entéropathogène
<b>ETEC</b>	« Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> entérotoxinogène
<b>ExPEC</b>	« Extra-intestinal pathogenic <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> pathogène extra-intestinal
<b>FITC</b>	Fluorescéine isothiocyanate
<b>HBMEC</b>	« Human brain microvascular endothelial cells » Cellules endothéliales de microvaisseaux de cerveau humain
<b>IC</b>	Index de compétition
<b>ITU</b>	Infection du tractus urinaire
<b>kb</b>	Kilobase
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharide
<b>MEM</b>	« Minimum essential medium » Milieu minimum essentiel
<b>MLEE</b>	« Multilocus enzyme electrophoresis » Électrophorèse des iso-enzymes
<b>MLST</b>	« <i>multilocus sequence typing</i> » Typage par séquençage multiple de gènes
<b>NB-DNJ</b>	<i>N</i> -butyldeoxynojirimycine
<b>NMEC</b>	« Neonatal meningitis <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> associé à la méningite néonatale



<b>PAI</b>	« Pathogenicity island » Îlot de pathogénicité
<b>PBS</b>	« Phosphate buffered saline » Tampon phosphate salin
<b>PCR</b>	« Polymerase chain reaction » Réaction de polymérisation en chaîne
<b>PNP</b>	p-nitrophényl
<b>RT-PCR</b>	« Reverse transcriptase PCR » PCR à transcription inverse
<b>SFB</b>	Sérum fœtal bovin
<b>SGB</b>	<i>Streptococcus</i> du groupe B
<b>SHS</b>	« Swollen head syndrome » Syndrome de la tête enflée
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SPATES</b>	« Serine protease autotransporters of <i>Enterobacteriaceae</i> » Autotransporteurs sérine protéase des <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>TBE</b>	Tampon tris/borate/EDTA
<b>TMP-SMX</b>	Triméthoprim-sulfaméthoxazole
<b>TNC</b>	Trop nombreux pour être comptés
<b>UFC</b>	Unités formatrices de colonies
<b>UPEC</b>	« Uropathogenic <i>Escherichia coli</i> » <i>Escherichia coli</i> uropathogène

## Table des matières

<b>Résumé</b> .....	<b>iii</b>
<b>Remerciements</b> .....	<b>v</b>
<b>Liste des figures</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des tableaux</b> .....	<b>vi</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>vii</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>x</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>1</b>
<b>Chapitre 1. Revue de littérature</b> .....	<b>2</b>
1.1 <i>Escherichia coli</i> .....	3
1.2 Les différentes méthodes de classification de <i>E. coli</i> .....	4
1.2.1 La classification sérologique .....	4
1.2.2 Les groupes phylogénétiques et la collection ECOR .....	5
1.2.3 La classification par pathotypes .....	6
1.2.3.1 Les souches pathogènes intestinales .....	8
1.2.3.2 Les souches pathogènes extra-intestinales (ExPEC) .....	10
1.3 Les souches uropathogènes (UPEC).....	11
1.3.1 La cystite .....	12
1.3.2 La pyélonéphrite.....	14
1.3.3 La bactériurie asymptomatique significative (BAS).....	15
1.4 Les souches causant la méningite néonatale (NMEC) .....	16
1.5 Les souches pathogènes aviaires (APEC) .....	17
1.5.1 L'aérosacculite et ses complications .....	18
1.5.2 L'infection de la membrane vitelline .....	19
1.5.3 Le syndrome de la tête enflée (SHS).....	20
1.5.4 La cellulite aviaire.....	20
1.6 Facteurs de virulences retrouvés chez les ExPEC .....	20
1.6.1 Les toxines.....	22
1.6.1.1 Les hémolysines.....	22
1.6.1.2 Le facteur cytotoxique nécrosant type 1 (CNF1).....	23

1.6.1.3	Les toxines de type autotransporteur .....	23
1.6.2	Les systèmes d'acquisition du fer .....	24
1.6.2.1	L'aérobactine .....	25
1.6.2.2	L'entérobactine .....	25
1.6.2.3	Les salmochélines .....	26
1.6.3	La résistance au sérum .....	27
1.6.3.1	Les polysaccharides .....	27
1.6.3.1.1	La capsule.....	27
1.6.3.1.2	Le lipopolysaccharide.....	28
1.6.3.2	Les protéines membranaires .....	29
1.6.3.2.1	Iss.....	29
1.6.3.2.2	TraT.....	30
1.6.4	Le flagelle .....	30
1.6.5	Les adhésines .....	32
1.6.5.1	Les adhésines fimbriaires .....	33
1.6.5.1.1	Les fimbriae de type 1 .....	33
1.6.5.1.1.1	Assemblage .....	33
1.6.5.1.1.2	Expression et régulation .....	36
1.6.5.1.1.3	Importance dans la virulence.....	40
1.6.5.1.2	Les fimbriae P .....	42
1.6.5.1.3	Les fimbriae S .....	43
1.6.5.1.4	Les fimbriae FIC.....	44
1.6.5.1.5	Les curli.....	44
1.6.5.1.6	Les fimbriae Stg .....	46
1.6.5.1.7	Les fimbriae AC/I.....	46
1.6.5.2	Les adhésines afimbriaires.....	47
1.6.5.2.1	L'adhésine Iha .....	47
1.6.5.2.2	Tsh.....	47
1.6.5.3	La famille d'adhésines Dr.....	48
1.7	Traitement des infections du tractus urinaire .....	49
1.7.1	Les antibiotiques .....	49

1.7.2	Alternatives aux traitements antibiotiques classiques.....	50
1.7.2.1	Changements dans les habitudes de vie.....	50
1.7.2.2	Les vaccins.....	51
1.7.2.3	L'utilisation de probiotiques.....	52
1.7.2.4	Les thérapies anti-adhérence.....	53
1.7.2.4.1	Les inhibiteurs de biosynthèse de récepteurs.....	53
1.7.2.4.2	Les analogues d'adhésines.....	54
1.7.2.4.3	Les analogues de récepteurs.....	56
1.7.2.4.3.1	Les glycodendrimères.....	57
<b>Chapitre 2. Matériels et méthodes.....</b>		<b>60</b>
2.1	Souches bactériennes, lignées cellulaires et plasmides.....	61
2.2	Création de souches mutantes.....	64
2.2.1	Technique de l'échange allélique.....	64
2.2.1.1	Conjugaison.....	66
2.2.1.2	Recombinaisons et sélections.....	66
2.2.1.3	Confirmation des mutations.....	67
2.2.1.3.1	Agglutination de levures sur lames de verre.....	67
2.2.1.3.2	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	68
2.2.2	Technique de Datsenko et Wanner.....	70
2.3	Molécules inhibitrices d'adhérence.....	72
2.3.1	Les monomères.....	73
2.3.2	La série des pentaérythritols.....	74
2.3.3	La série des cyclotriphosphazènes.....	75
2.4	Infections dans le modèle murin.....	77
2.4.1	Co-infections montrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation.....	77
2.4.1.1	Préparation de l'inoculum.....	77
2.4.1.2	Anesthésie des souris.....	78
2.4.1.3	Inoculation des souris.....	78
2.4.1.4	Nécropsie et prélèvement des organes.....	79
2.4.1.5	Traitement des organes et prise des résultats.....	79
2.4.2	Mono-infections avec un inhibiteur d'adhérence.....	80

2.5	Agglutination de levures en microplaques .....	81
2.6	Tests d'adhérence .....	81
2.6.1	Cellules en culture.....	81
2.6.2	Coupes congelées d'organes .....	82
2.6.2.1	Récolte et coupe des organes .....	82
2.6.2.2	Marquage des bactéries.....	83
2.6.2.3	Tests d'adhérence .....	84
2.6.2.4	Observation.....	84
<b>Chapitre 3. Résultats .....</b>		<b>86</b>
3.1	Création de souches mutantes .....	87
3.2	Co-infections démontrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation ...	87
3.3	Agglutination de levures en microplaques .....	91
3.4	Tests d'adhérence .....	92
3.4.1	Cellules T24 et HeLa en culture .....	92
3.4.2	Coupes congelées d'organes .....	93
3.4.2.1	Vessies de souris.....	93
3.4.2.2	Trachées de poulets.....	94
3.4.2.3	Poumons de poulets .....	95
3.5	Mono-infections avec un inhibiteur d'adhérence.....	96
<b>Chapitre 4. Discussion .....</b>		<b>98</b>
4.1	Co-infections démontrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation ...	99
4.2	Agglutinations de levures en microplaques .....	100
4.3	Tests d'adhérence .....	101
4.3.1	Cellules T24 et HeLa en culture .....	101
4.3.2	Coupes congelées d'organes .....	102
4.3.2.1	Vessies de souris et trachées de poulets .....	102
4.3.2.2	Poumons de poulet.....	103
4.4	Mono-infections avec un inhibiteur d'adhérence.....	104
<b>Conclusions.....</b>		<b>105</b>
<b>Références.....</b>		<b>107</b>



## Introduction

Les infections causées par des souches de *Escherichia coli* pathogènes extra-intestinales (ExPEC) peuvent entraîner de graves problèmes de santé autant chez les humains que chez certains animaux. Ce sont d'ailleurs les ExPEC qui sont responsables de 80 % des infections du tractus urinaire (ITU) dont seront victimes au cours de leur vie tout près d'une femme sur deux (Foxman, 1990; Nicolle, 2003; Ronald, 2003). Ces souches peuvent aussi causer d'importants ravages dans les élevages de volaille en causant une variété d'infections dont la principale atteint le système respiratoire et peut dégénérer en se propageant à d'autres organes tels que le cœur ou le foie (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994). Les ExPEC peuvent aussi causer d'autres infections pouvant aller jusqu'à entraîner la mort telles que la méningite néonatale et la septicémie.

Jusqu'à ce jour, les seuls traitements reconnus comme cures contre les infections par les ExPEC sont de type antibiotique. Malheureusement, dans les dernières années, le nombre d'infections causées par des ExPEC résistantes à certains antibiotiques est monté en flèche. Le besoin de trouver des traitements alternatifs aux antibiotiques est criant puisque si les résistances continuent de se répandre à cette vitesse, d'ici quelques années les antibiotiques ne seront plus efficaces contre les ExPEC (Gupta, 2003; Karlowsky *et al.*, 2002).

Dans la quête à de nouvelles solutions de traitement, il est important de chercher à cibler des structures ou des caractéristiques importantes dans la virulence des ExPEC afin de trouver un moyen de les empêcher d'établir une infection. Une des premières étapes dans le processus d'infection chez une grande partie des agents pathogènes est de trouver un moyen de physiquement s'ancrer au site d'infection désiré pour pouvoir se multiplier et ainsi créer des dommages localisés. Afin de s'attacher solidement, les bactéries ont besoin d'établir une liaison forte et difficile à briser avec un tissu hôte. Une des meilleures façons d'y parvenir est d'établir une liaison entre des structures de surfaces des bactéries et des cellules hôtes. Lorsqu'un tel lien est possible, la molécule de surface bactérienne est appelée adhésine et celle de l'hôte est son récepteur (Ofek *et al.*, 2003).

Dans bien des cas, une adhérence initiale forte est essentielle à l'établissement d'une infection. Si l'on prend l'exemple des infections urinaires, l'absence d'adhérence ou une adhérence faible aux parois de la vessie permettrait facilement au flot naturel d'urine d'emporter les bactéries et ainsi prévenir l'infection. Dans d'autres cas comme celui de la méningite néonatale, une adhérence stable aux cellules de la barrière hématoencéphalique est essentielle pour que d'autres molécules de surfaces puissent s'y lier et ainsi déclencher une cascade permettant de traverser la barrière. Cette étape est essentielle à l'infection puisque sans elle, les bactéries ne rejoindraient même pas les méninges cérébraux, leur principal site d'infection (Kaper *et al.*, 2004; Kim, 2003).

Dans les deux cas ici énoncés, l'adhésine en cause est la protéine FimH présente à l'extrémité des fimbriae de type 1. Cette structure de surface est présente chez la majorité des souches ExPEC et permet l'adhérence à un bon nombre de tissus grâce à son affinité pour des récepteurs hôtes qui sont mannosylés. Si l'on pouvait interférer efficacement avec les liaisons effectuées par les fimbriae de type 1, un bon nombre d'infections pourraient être prévenues ou traitées et ce, sans la contribution d'antibiotiques, éliminant alors le problème croissant de résistance.

Une stratégie pour interférer avec le phénomène d'adhérence est de mettre en grande concentration, au site d'infection, des molécules qui imitent les récepteurs des fimbriae. De cette façon, les sites de liaison des fimbriae pourraient être bloqués par les molécules en solution, empêchant ainsi les bactéries d'établir un contact avec les cellules hôtes. Puisque les fimbriae de type 1 reconnaissent des récepteurs mannosylés, la présence de molécules de mannose en solution pourrait facilement servir d'inhibiteur d'adhérence (Ofek *et al.*, 2003).

Afin d'obtenir une inhibition d'adhérence accrue, des équipes de chimistes ont travaillé sur la conception de molécules ramifiées qui comportent plusieurs unités mannosylées à leurs surfaces. Parmi ces équipes figure celle du professeur René Roy de l'UQAM. Les chimistes de son équipe ont conçu une variété de molécules appelées glycodendrimères mannosylés pouvant porter jusqu'à 18 molécules de mannose.

Une collaboration avec l'équipe de René Roy a été établie afin de vérifier l'hypothèse selon laquelle les glycodendrimères mannosylés auraient la capacité



d'interférer avec l'adhérence des ExPEC. L'objectif de la présente étude consiste donc à déterminer la capacité de différents glycodendrimères mannosylés à bloquer l'adhérence par le fimbriae de type 1 de souches ExPEC. Pour ce faire, des tests d'inhibition d'adhérence seront effectués en présence de levures, de cellules en cultures et de coupes congelées d'organes. Par contre, avant de pouvoir évaluer l'efficacité de ces molécules, différentes souches ExPEC devront subir des mutations afin de les rendre déficientes pour le fimbriae de type 1. Ces souches pourront ensuite servir de contrôles négatifs dans toutes les expériences à suivre. De plus, des infections de tractus urinaires murins auront lieu afin de déterminer si les fimbriae de type 1 ont la même implication dans la colonisation du tractus urinaire par différentes souches uropathogènes.

Au cours de cet ouvrage les méthodes utilisées afin de mettre à terme toutes les expériences permettant d'atteindre l'objectif final seront énoncées en détails. Les résultats de ces expériences seront ensuite décrits et graphiquement présentés. Ces résultats seront finalement analysés puis interprétés afin d'en arriver aux conclusions de l'étude.

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

## 1.1 *Escherichia coli*

En 1885, le pédiatre Allemand Theodor Escherich a isolé une bactérie des fèces d'un de ses jeunes patients et il la nomma *Bacterium coli commune*. C'est seulement en 1919, quelques années après la mort du docteur Escherich, que le nom d'*Escherichia coli* a été proposé en son honneur par Castellani et Chalmers (Shulman *et al.*, 2007). *E. coli* est une bactérie Gram-négative, anaérobie facultative, de la famille des *Enterobacteriaceae* et elle est l'un des micro-organismes les plus étudiés et les plus utilisés en laboratoire à ce jour (Dobrindt, 2005; Prescott *et al.*, 2003).

Représentant environ 0,1 % de la flore normale intestinale des mammifères, *E. coli* en est l'organisme Gram-négatif le plus abondant qui se cultive en laboratoire (Prescott *et al.*, 2003). Tout au long de la vie d'un individu, cette microflore intestinale contribue au maintien d'une muqueuse intestinale saine et bien structurée, ainsi qu'au recrutement et à l'établissement d'une bonne population d'immunocytes et autres cellules inflammatoires dans l'intestin. C'est cette population cellulaire qui constitue la première barrière immune contre un grand nombre d'entéropathogènes invasifs (Farthing, 2004).

Puisque nous vivons littéralement en symbiose avec cette microflore, une grande variété de souches de *E. coli* qui en font partie et qui sont non-pathogènes sont considérées comme étant des souches commensales (Farthing, 2004; Kaper *et al.*, 2004). Par contre, comme elles sont constamment en contact rapproché avec une multitude d'espèces bactériennes dont certaines sont pathogènes, plusieurs souches de *E. coli* ont pu évoluer et acquérir différents facteurs de virulence par transfert horizontal de plasmides, de transposons, de prophages ou d'îlots de pathogénicité (Dobrindt, 2005; Dozois et Curtiss, 1999). Ceux-ci leur ont donné la capacité d'envahir, de persister et de causer des pathologies dans des organes ou des hôtes jusqu'alors impossibles à envahir par les souches commensales (Dozois et Curtiss, 1999; Kaper *et al.*, 2004). Comme la gamme de facteurs de virulence pouvant être acquis est très variée, les pathologies causées par ces différentes souches sont toutes aussi diversifiées. C'est pourquoi différentes méthodes ont été développées pour classifier ces nombreuses souches commensales et pathogènes de *E. coli*.

## 1.2 Les différentes méthodes de classification de *E. coli*

### 1.2.1 La classification sérologique

La classification sérologique de *E. coli* est l'une des méthodes de classification les mieux établies (Lior, 1994). Cette classification a été mise au point et utilisée pour la première fois dans les années 40 par Fritz Kauffmann, un bactériologiste danois (Robins-Browne et Hartland, 2002). La classification sérologique est basée sur l'identification de trois antigènes de surface, soit le O, le K et le H et catégorise les isolats de *E. coli* pathogènes autant que les non-pathogènes.

L'antigène O, qui à lui seul définit le sérotype d'une souche, est une courte chaîne polysaccharidique qui fait partie du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS est un des principaux constituants de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. En plus d'une chaîne latérale O, les LPS sont constitués d'un polysaccharide central et d'un lipide A (Prescott *et al.*, 2003). On dénombre à ce jour tout près de 170 différents antigènes O, mais certains de ceux-ci sont plus spécifiquement associés à des symptômes cliniques que d'autres (Lior, 1994; Nataro et Kaper, 1998).

L'antigène K est celui qui représente la capsule. Cette structure généralement constituée de polysaccharides souvent acides n'est pas présente chez toutes les souches de *E. coli* (Lior, 1994). La capsule n'est pas nécessaire à la croissance de la bactérie mais lui confère plutôt une meilleure survie dans certains environnements hostiles (Prescott *et al.*, 2003). Plus de 80 différents polysaccharides K ont été identifiés jusqu'à présent (Whitfield et Roberts, 1999).

Le dernier antigène à déterminer le sérotype est l'antigène H ou le flagelle. Cet organelle servant à la motilité est composé de trois principales structures. Le corps basal, constitué d'un axe et de différents anneaux, permet l'ancrage du flagelle dans la membrane plasmique. Le filament est la longue structure de flagelline qui sert d'hélice à la bactérie qui se déplace. Quant au crochet, il est la structure courbe qui sert de lien entre le filament et le corps basal (Prescott *et al.*, 2003). C'est en fait différents déterminants sérologiques retrouvés sur la flagelline qui déterminent la nature de l'antigène H. On a identifié à ce jour 53 différents antigènes H (Lior, 1994).

## 1.2.2 Les groupes phylogénétiques et la collection ECOR

En 1984, Ochman et Selander ont mis sur pied une collection de souches de *E. coli* de référence (collection ECOR). Cette collection a été créée pour toute la communauté scientifique dans le but de permettre d'étendre les différentes recherches sur *E. coli* à une population de souches de provenances naturelles avec un bagage génétique varié. Les 72 souches de la collection ont été choisies parmi 2600 isolats de sources naturelles. Les souches ont été sélectionnées en fonction d'obtenir la plus grande diversité possible d'hôtes et d'origines géographiques, mais aussi une bonne variété de profils enzymatiques (Ochman et Selander, 1984). Ces profils tiennent compte de la diversité de 11 enzymes analysées et ont été étudiés grâce à la technique du MLEE (*multilocus enzyme electrophoresis*) (Ochman et Selander, 1984; Whittam *et al.*, 1983). Cette méthode permet d'étudier la variation allélique de plusieurs loci selon la motilité électrophorétique des enzymes hydrosolubles correspondantes. La vitesse de migration étant directement liée à la charge électrostatique net qui elle est déterminée, dans le cas des protéines, par la séquence en acides aminés, les variants sont alors séparés par le gel (Selander *et al.*, 1986).

Puisque la portée du MLEE était plutôt limitée, de nouveaux outils ont été développés afin d'effectuer des études phylogénétiques plus justes et plus étendues. L'une des techniques les plus utilisées de nos jours est le MLST (*multilocus sequence typing*) qui consiste à analyser les séquences de 500 à 600 pb de multiples gènes d'entretien (*housekeeping genes*) très conservés (Maiden *et al.*, 1998; Noller *et al.*, 2003). Dans les années qui ont suivi la création de la collection ECOR, plusieurs études phylogénétiques des souches de la collection ECOR ont été effectuées par différentes équipes de recherche et cinq groupes phylogénétiques majeurs ont finalement été déterminés, soit les groupes A, B1, B2, D et E (Herzer *et al.*, 1990; Jaureguy *et al.*, 2008; Picard *et al.*, 1999).

L'équipe de Clermont a aussi établi une technique de PCR multiplex permettant d'identifier, avec une mince marge d'erreur, le groupe phylogénétique d'un isolat en une seule réaction (Clermont *et al.*, 2000). Tout d'abord, le groupe A est celui qui contient le plus d'isolats non-pathogènes telles les souches K-12. Le groupe B se retrouve quant à

lui divisé en deux parties qui se distinguent par le groupe d'hôtes duquel les souches ont été isolées. Les souches B1 ont surtout été isolées chez des mammifères non-primates, tandis que les souches B2 ont plutôt été récoltées chez l'homme et chez d'autres espèces primates. Le groupe D contient une forte proportion de souches pathogènes. Quand au groupe E, il ne représente que les quelques souches n'ayant pu être classées parmi les principaux groupes (Boyd et Hartl, 1998; Herzer *et al.*, 1990; Picard *et al.*, 1999).

De nombreuses études ont démontré qu'une grande majorité des marqueurs de virulence connus, typiques des souches causant des infections extra-intestinales, se retrouvent en beaucoup plus fortes concentrations chez les groupes B2 et D que les groupes A et B1 (Boyd et Hartl, 1998; Johnson et Stell, 2000; Johnson *et al.*, 2001a; Johnson *et al.*, 2001b; Russo et Johnson, 2000; Zhang *et al.*, 2002). De plus, des études de létalité dans un modèle d'infection extra-intestinale *in vivo* murin ont confirmé le caractère virulent de presque toutes les souches B2, de plusieurs souches D et de peu de souches A et B1 (Picard *et al.*, 1999). Pour ce qui est des souches pathogènes intestinales, elles sont plus réparties phylogénétiquement. On les retrouve en bonnes proportions surtout chez les groupes A, B1 et D et moins fréquemment dans le groupe B2 (Russo et Johnson, 2000).

### **1.2.3 La classification par pathotypes**

La méthode de classification par pathotypes, parfois aussi appelés virotypes, s'applique spécifiquement qu'aux souches de *E. coli* pathogènes puisque les isolats sont classés selon le type de pathologies qu'ils causent et souvent selon les stratégies utilisées pour causer ces maladies spécifiques, les souches de *E. coli* non pathogènes sont donc exclues de cette classification (Salyers et Whitt, 2002). Bien qu'ils soient décrits en détails dans les sections qui suivent, le **Tableau 1.1** offre un résumé des principales caractéristiques des plus importants pathotypes de *E. coli* causant des infections intestinales et extra-intestinales.

**Tableau 1.1** Les différents pathotypes de *Escherichia coli*.

Type d'infection	Pathotype	Principaux symptômes	Caractéristiques
Intestinale	ETEC	Diarrhée aigue aqueuse.	Entérotoxines thermolabiles et/ou thermostables.
	EPEC	Diarrhée aigue aqueuse, déshydratation et symptômes de malnutrition.	Capacité à réorganiser le cytosquelette des microvillosités et à former des lésions attachantes-effaçantes.
	EHEC	Diarrhée sanglante et douloureuse.	Capacité à former des lésions attachantes-effaçantes et production de Shiga-toxines.
	EAEC	Diarrhée persistante aqueuse et mucoïde.	Adhérence de type aggrégatif et production de toxines.
	EIEC	Diarrhée dysentérique.	Capacité d'invasion des cellules épithéliales.
	DAEC	Diarrhée surtout infantile.	Adhérence diffuse.
Extra-intestinale	UPEC	Infection de la vessie et parfois des reins. Douleurs au bas ventre, envie fréquente d'uriner et miction pénible. Dans le cas d'une atteinte aux reins, fièvre et douleur au centre du dos.	Adhérence grâce à plusieurs adhésines, production de toxines, systèmes d'acquisition du fer et flagelle.
	NMEC	Hausse de la pression intracrânienne, douleur à la tête, fièvre et possibilité de dommages neurologiques.	Adhérence grâce à plusieurs adhésines, capacité à traverser la barrière hématoencéphalique, production de toxines, systèmes d'acquisition du fer et flagelle.
	APEC	Variété d'infections systémiques ou localisés chez des animaux de volaille de l'embryon à l'adulte.	Adhérence grâce à plusieurs adhésines, production de toxines, systèmes d'acquisition du fer et flagelle.

### 1.2.3.1 Les souches pathogènes intestinales

Tous les pathogènes intestinaux, incluant certaines souches de *E. coli*, doivent passer par les mêmes grandes étapes d'infections. Suite à la colonisation de l'intestin, ces pathogènes doivent contrer différents mécanismes de défense de l'hôte, se multiplier et finalement créer un certain dommage. Six pathotypes de *E. coli* causant des maladies intestinales ont été décrits à ce jour et ils adoptent tous des stratégies différentes pour traverser ces quatre étapes d'infection (Nataro et Kaper, 1998; Salyers et Whitt, 2002).

Les souches de *E. coli* entérotoxigènes (ETEC) sont reconnues pour la production d'au moins une entérotoxine de type thermolabile ou thermostable qui stimule la sécrétion excessive de fluides par l'hôte et donc le déclenchement d'une diarrhée aigue aqueuse. Des bactéries de ce pathotype sont d'ailleurs grandement responsables d'une diarrhée chez les jeunes enfants dans les pays sous-développés ainsi que de la diarrhée du voyageur (Nataro et Kaper, 1998).

Ce qui caractérise les souches de *E. coli* entéropathogène (EPEC) est leur faculté à adhérer aux entérocytes en formant des microcolonies et leur capacité à réorganiser le cytosquelette des microvillosités de l'intestin. On observe alors des lésions que l'on qualifie de type attachante-effaçante ainsi que des structures proéminentes ressemblant à des piédestaux sur lesquels les bactéries se perchent (Kaper *et al.*, 2004). L'absence de microvillosité provoque une réduction significative de l'absorption intestinale, causant alors une diarrhée aigue aqueuse ainsi qu'une déshydratation et des symptômes de malnutrition (Farthing, 2004; Nataro et Kaper, 1998).

Les souches de *E. coli* entérohémorragique (EHEC) causent aussi des lésions de type attachante-effaçante ainsi que des structures en forme de piédestal, mais elles se différencient des EPEC par une production de Shiga-toxines, aussi appelées vérotoxines, qui provoquent une sécrétion excessive de fluides en plus d'induire une forte réponse inflammatoire, causant donc une douloureuse diarrhée sanglante. Ce pathotype, dont fait parti le fameux sérotype O157:H7, est reconnu pour ses ravageuses éclosions causées par des contaminations alimentaires ou des contaminations de réserves d'eau potables (Nataro et Kaper, 1998).



Autre fois considérées comme faisant partie des EPEC, les *E. coli* entéroaggrégative (EAEC) se distinguent de ce groupe par leur façon particulière d'adhérer aux cellules hôtes. Elles ont une adhérence de type agrégatif dont est responsable un fimbria nommé AAF/I (Nataro *et al.*, 1994). Le contact intime des EAEC avec les tissus hôtes provoque une surproduction de mucus qu'elles utilisent alors pour former d'importants biofilms. Ce pathotype peut aussi produire différentes toxines qui ont des effets cytotoxiques tels le rétrécissement ou la nécrose hémorragique des microvillosités et une réponse inflammatoire avec œdème. C'est cette inflammation jumelée à la sécrétion excessive de mucus qui sont responsables de la diarrhée persistante aqueuse et mucoïde causée par les EAEC. Les principales victimes de ce pathotypes sont les jeunes enfants dans les pays en voie de développement (Kaper *et al.*, 2004; Nataro et Kaper, 1998).

Les souches de *E. coli* entéroinvasive (EIEC) ont pour particularité de posséder, tout comme *Shigella sp.*, plusieurs protéines de surfaces (IpaA à IpaD) qui permettent l'invasion des cellules épithéliales du colon (Farthing, 2004). Une fois l'invasion d'une cellule réussie, les EIEC sont capable de s'y multiplier, de se répandre dans les cellules voisines et de causer des dommages qui provoquent généralement une diarrhée dysentérique. Les EIEC étant fortement apparentés à *Shigella sp.*, les deux pathogènes sont bien souvent difficiles à distinguer (Nataro et Kaper, 1998).

Tout comme les EAEC, les *E. coli* à adhérence diffuse (DAEC) étaient autrefois considérées comme des EPEC. Les DAEC se sont quant à elles distinguées des autres groupes par leur adhérence diffuse. Lorsque ce pathogène adhère à des cellules en culture, on remarque l'absence de microcolonie ou d'agrégation des bactéries, mais on observe plutôt un motif d'adhérence diffus. C'est principalement l'adhésine afimbriaire de la famille des autotransporteurs nommée AIDA-I ainsi que l'adhésine F1845 de la famille des fimbriae Dr qui sont responsables de ce type d'adhérence (Benz et Schmidt, 1989; Bilge *et al.*, 1989; Nowicki *et al.*, 1990). Le contact avec des DAEC provoque chez les entérocytes la formation de longues extensions cellulaires capables de s'enrouler autour des bactéries. La production de ces structures permettrait aussi le déclenchement d'une cascade enzymatique complexe qui serait à l'origine de la diarrhée généralement associée aux enfants (Kaper *et al.*, 2004; Nataro et Kaper, 1998).

### 1.2.3.2 Les souches pathogènes extra-intestinales (ExPEC)

L'acronyme ExPEC a été proposé en 2000 par Russo et Johnson dans le but de regrouper les souches qui causent des infections extra-intestinales. Ces derniers avaient cru bon de rassembler les souches pathogènes extra-intestinales dans un même pathotype puisque plusieurs de ces souches ont la capacité de causer des infections extra-intestinales dans différents sites (Johnson et Russo, 2002; Russo et Johnson, 2000). Ces souches ne pouvant pas faire partie d'un seul pathotype spécifique à un site d'infection, elles sont alors reconnues comme faisant partie des ExPEC (Russo et Johnson, 2000). Malgré que certaines souches soit versatiles, il existe aussi des souches spécifiques à certaines niches anatomiques, d'où l'importance de continuer à utiliser les sous-pathotypes distincts tels que les *E. coli* uropathogènes (UPEC), les *E. coli* pathogènes aviaires (APEC) et les souches causant des méningites néonatales (NMEC) faisant tous partie de la grande famille des ExPEC (Johnson *et al.*, 2008).

Pour qu'une souche soit classée dans le groupe des ExPEC, cette dernière doit posséder des facteurs de virulence reconnus et typiques aux ExPEC ou doit être clairement virulente dans un modèle animal d'infection extra-intestinale (Russo et Johnson, 2000). Les souches ExPEC peuvent généralement vivre en commensalisme dans le tractus intestinal, mais peuvent causer des infections dans un seul ou plusieurs sites anatomiques comme le tractus urinaire, le sang, le liquide céphalorachidien, les voies respiratoires, le péritoine et d'autres organes (Russo et Johnson, 2003).

Aux États-Unis, plus de 9 millions de gens contractent des infections causées par des souches ExPEC chaque année. Ces infections entraînent des coûts de près de 10 milliards de dollars américains par année en traitements et en hospitalisation. Malgré ces statistiques, rarement on entend parler des ExPEC dans les médias comme causant de graves problèmes de morbidité ou de mortalité ni comme d'un groupe pathogène entraînant d'importants coûts au système de santé. Cela est dû au fait que dans le passé, très peu de résistances aux antibiotiques étaient retrouvées et propagées chez les ExPEC. Par contre, dans les dernières années, on observe chez les patients infectés, de plus en plus de souches ExPEC résistantes à certains antibiotiques comme le triméthoprim-sulfaméthoxazole (TMP-SMX), les fluoroquinolones et les  $\beta$ -lactamines. Le problème

des infections aux ExPEC est donc en pleine expansion et ces infections sont de plus en plus difficiles à contrôler, d'où l'importance d'étudier de nouvelles méthodes de prévention ainsi que de nouveaux traitements contre les ExPEC (Russo et Johnson, 2003).

Bien qu'il existe plusieurs sous-groupes d'ExPEC, je développerai plus en profondeur dans les sections qui suivent sur les principaux, soit les UPEC, les NMEC et les APEC. Ces groupes sont aussi ceux qui seraient visés si une thérapie ciblant l'adhérence par le fimbriae de type I venait à être développée.

### **1.3 Les souches uropathogènes (UPEC)**

Les infections du tractus urinaire (ITU) touchent environ 50 % des femmes au moins une fois dans leur vie (Foxman *et al.*, 2000). Plus du quart des femmes infectées subiront au moins une récurrence dans les six mois suivants l'infection initiale (Foxman, 1990). Suivant de près les infections respiratoires, les ITU sont la deuxième cause d'hospitalisation aux États-Unis, infectant de 6 à 8 millions de gens par année (Russo et Johnson, 2003). Les souches d'*E. coli* uropathogènes (UPEC) sont responsables d'environ 80 % des ITU non compliquées (Nicolle, 2003; Ronald, 2003).

On divise souvent les infections du tractus urinaire en deux grands groupes, soit les ITU compliquées et les ITU non compliquées. Une ITU est jugée compliquée lorsque le patient qui en est victime a une anomalie fonctionnelle, métabolique ou structurelle, comme par exemple une malformation du tractus urinaire, une maladie tel que le diabète, une blessure à la moelle épinière ou bien l'insertion récente d'un cathéter dans l'urètre (Ronald, 2003). Ces anomalies interfèrent toutes avec différents éléments des défenses de l'hôte, c'est pourquoi les gens qui en sont victimes sont plus susceptibles d'être atteint par une ITU et que celle-ci est considérée compliquée (Schaeffer, 2001). Comme l'étiologie et la pathogénèse de ces infections sont complexes et influencées par un grand nombre de facteurs qui varient énormément d'un cas à l'autre, je m'attarderai surtout, dans cet ouvrage, aux ITU non compliquées.

Les ITU sans complications surviennent beaucoup plus fréquemment chez les femmes que chez les hommes et plusieurs facteurs en sont responsables. D'abord la distance entre l'anus, source de contamination fécale d'où proviennent les uropathogènes,

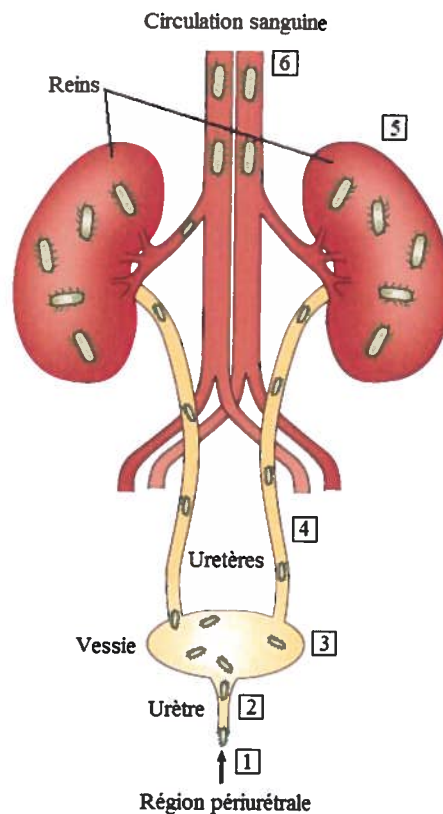
et le méat urinaire est beaucoup plus importante chez l'homme que chez la femme. Aussi, l'urètre masculin est beaucoup plus long à parcourir par les bactéries que celui de la femme. Ce délai risque donc de permettre au flot d'urine de l'homme d'interrompre l'ascension bactérienne bien avant la colonisation initiale de la vessie. De plus, les hommes sont davantage protégés des ITU grâce à l'activité antimicrobienne de leurs fluides prostatiques (Ulleryd, 2003).

Chez les femmes, certains facteurs peuvent augmenter la prédisposition aux ITU. Le simple fait d'être active sexuellement augmente considérablement le risque de contracter une ITU. Les activités sexuelles favorisent la contamination de la région périurétrale par la flore vaginale qui contient parfois des uropathogènes. De plus, les rapports sexuels peuvent favoriser et accélérer l'ascension des bactéries dans l'urètre vers la vessie (Foxman et Frerichs, 1985b). Parmi les femmes sexuellement actives, celles qui utilisent certains moyens de contraception, tels le diaphragme, le condom et les spermicides, sont davantage prédisposées à contracter une ITU (Fihn *et al.*, 1996; Foxman et Frerichs, 1985a; Foxman et Frerichs, 1985b; Scholes *et al.*, 2000).

### 1.3.1 La cystite

En général, les ITU non compliquées évoluent de manière ascendante dans le tractus urinaire, tel qu'illustré dans la **Figure 1.1**. Tout d'abord l'intestin de l'individu doit se faire coloniser par une souche de *E. coli* uropathogène qui s'y comportera comme une souche commensale tant qu'elle y restera. S'ensuit une contamination fécale-périurétrale par la souche en question (Kaper *et al.*, 2004). Certaines souches ont aussi la capacité d'établir un réservoir intermédiaire dans le vagin, ce qui facilitera la prolifération et contamination subséquente encore plus importante de la région périurétrale (Xie *et al.*, 2006). Lorsque le méat urinaire est finalement contaminé, il y a ascension vers la vessie par l'urètre pour y causer une cystite. Les bactéries adhèrent alors aux cellules uroépithéliales principalement grâce aux fimbriae de type 1 présents à leurs surfaces, ce qui leurs permettra de persister dans la vessie sans être emportées par le flot d'urine. L'adhérence provoquera aussi l'apoptose et l'exfoliation de cellules de l'uroépithélium (Kaper *et al.*, 2004). Le patient atteint d'une cystite aura de la douleur au bas du ventre, une envie fréquente d'uriner et une miction pénible (Stamm *et al.*, 1989).

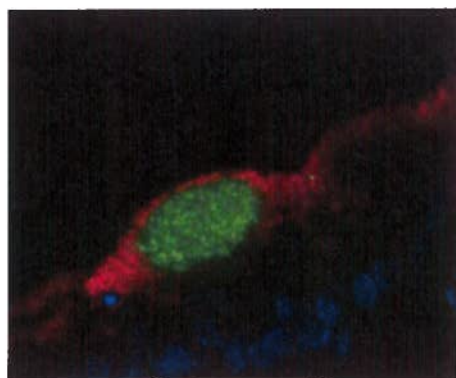
En plus de leur capacité à adhérer, il a été découvert dans les dernières décennies que certaines souches UPEC peuvent même envahir les cellules uroépithéliales et que ce phénomène a lieu encore une fois grâce aux fimbriae de type 1 (Martinez *et al.*, 2000; McTaggart *et al.*, 1990; Mulvey *et al.*, 1998). Encore plus récemment, on a découvert que ces bactéries envahissent les cellules dans le but de s'y répliquer et ainsi former ce que l'on appelle des communautés bactériennes intracellulaires (CBI) (Justice *et al.*, 2004; Mulvey *et al.*, 2001b). Comme on peut l'observer sur la **Figure 1.2**, ces communautés ont l'apparence d'un renflement à la surface des cellules et ont une organisation qui rappelle celle des biofilms (Anderson *et al.*, 2003).



**Figure 1.1** Pathogénèse de l'infection ascendante du tractus urinaire.

Représentation d'un tractus urinaire normal infecté par *E. coli*. 1. Contamination fécale-périurétrale. 2. **Urétrite**, les bactéries remontent l'urètre vers la vessie. 3. **Cystite**, la vessie colonisée, les bactéries adhèrent à l'uroépithélium, se répliquent et provoquent de l'inflammation. 4. **Urétérite**, des bactéries remontent les uretères vers les reins. 5. **Pyélonéphrite**, les reins sont colonisés et des dommages sont causés aux tissus. 6. **Septicémie**, si les dommages aux reins sont trop importants, les bactéries passent dans la circulation sanguine provoquant alors une infection systémique (modifié de Kaper *et al.*, 2004).

Dans le cadre d'une ITU, les CBI sont en quelque sorte de petites usines à bactéries qui sont à l'abri des défenses immunes de l'hôte, de plusieurs antibiotiques ainsi que du flot d'urine. Les bactéries qui y sont produites peuvent donc être relâchées à tout moment et faire progresser rapidement l'infection (Mulvey *et al.*, 2001b). À plus long terme, ces CBI peuvent aussi servir de réservoirs bactériens quiescents. La cystite en apparence terminée pourrait donc ré-émerger quelques semaines ou même quelques mois après avoir été considérée guérie. Des souches qui forment facilement des CBI pourraient donc bien souvent être la cause des infections récurrentes, phénomène que l'on a toujours attribué à des réinfections à partir du réservoir intestinal ou vaginal initial (Mulvey *et al.*, 1998; Mulvey *et al.*, 2001b). Sachant que la souche isolée lors d'infections récurrentes est souvent identique à celle isolée lors de l'infection initiale, la thèse des CBI est fort plausible (Mulvey *et al.*, 2001b; Russo *et al.*, 1995).



**Figure 1.2** Image d'une CBI colorée par immunohistochimie.

Image de microscopie confocale d'une coupe de vessie murine récoltée à 6h post-infection par une souche UPEC reconnue pour produire des CBI (UTI89). Les coupes ont été traitées avec trois anticorps couplés à différents fluorochromes afin d'obtenir un marquage des bactéries en vert, des cellules de l'uroépithélium superficiel en rouge et des noyaux en bleu (Wright *et al.*, 2007).

### 1.3.2 La pyélonéphrite

Certaines souches ne sont connues que pour causer des cystites, mais d'autres ne s'arrêtent pas à cet organe. Une fois la vessie bien colonisée, ces souches prennent alors le chemin des uretères pour aller coloniser les reins, causant alors une pyélonéphrite, tel qu'illustré à la **Figure 1.1**. Dans les reins, les bactéries adhèrent aux tissus rénaux grâce aux fimbriae P et sécrètent des hémolysines, ce qui provoque des lésions importantes à

l'épithélium. Lorsque l'infection n'est pas traitée assez rapidement, les bactéries peuvent endommager les minces tubules des reins, s'ouvrant alors le passage vers la circulation sanguine. Dans ce cas là, l'ITU peut devenir une septicémie et ainsi, se reprendre dans l'organisme. Lorsque l'infection est à un stade systémique, il est beaucoup plus difficile de la contrôler (Kaper *et al.*, 2004). Un patient souffrant d'une pyélonéphrite sera nécessairement fiévreux, aura d'importantes douleurs dans le centre du dos et pourrait aussi avoir une fonction rénale déficiente (Nataro et Levine, 1994).

### **1.3.3 La bactériurie asymptomatique significative (BAS)**

Parfois, lorsque certaines souches colonisent le tractus urinaire, le scénario est tout autre que ceux décrits dans les paragraphes précédents. En effet, il existe des souches de *E. coli* qui causent des bactériuries asymptomatiques significatives (BAS). On considère que l'on est confronté à une BAS lorsque la charge bactérienne urinaire atteint ou dépasse  $10^5$  UFC/mL et qu'aucun symptôme génito-urinaire ou systémique n'est décelable (Foxman, 2002; Nicolle *et al.*, 2005). Les jeunes filles d'âge scolaire, les femmes enceintes, les personnes âgées, les personnes diabétiques et les gens qui doivent se faire régulièrement installer un cathéter ou pour de longues périodes de temps sont les groupes les plus touchés par les BAS (Colgan *et al.*, 2006; Nicolle *et al.*, 2005; Raz, 2003).

La majorité des gens peuvent facilement vivre de longues périodes de temps avec une BAS sans rencontrer de symptômes et souvent sans même s'en rendre compte. Par contre, les BAS représentent un danger pour les femmes attendant un enfant car cette bactériurie peut provoquer des contractions utérines prématurées. Il est donc conseillé de passer un test pour les BAS tôt durant une grossesse et il est nécessaire d'administrer un traitement antibiotique à toutes femmes enceintes testées positives (Nicolle *et al.*, 2005).

On sait que beaucoup de souches causant des BAS sont fortement apparentées aux UPEC, mais que la plupart possèdent un génome plus restreint. Certaines d'entre elles ont tout simplement perdus plusieurs gènes codants pour des facteurs de virulence et d'autres ont plutôt perdu la capacité de les exprimer efficacement (Zdziarski *et al.*, 2008). La majorité des souches ne possède donc aucun système fimbriaire fonctionnel parmi ceux qui favorisent la colonisation du tractus urinaire, soit les fimbriae de type 1, P et F1C. On croit par contre que ces souches réussissent à persister dans le

tractus urinaire grâce à une vitesse de croissance supérieure à celle des souches causant des ITU symptomatiques et parce que l'absence de fimbriae permet d'éviter une forte réponse immunitaire (Roos *et al.*, 2006).

#### **1.4 Les souches causant la méningite néonatale (NMEC)**

Dans les pays industrialisés, depuis les années 1990, l'incidence de méningites néonatales est d'environ de 0,11 à 0,32 cas par 1000 naissances et 20 à 30 % des nouveau-nés atteints en décèdent (de Louvois *et al.*, 1991; Hristeva *et al.*, 1993; May *et al.*, 2005). Des survivants, plus de la moitié gardent d'importantes séquelles neurologiques de la maladie tels que de l'hydrocéphalie, des convulsions, des paralysies et autres troubles neurologiques (Unhanand *et al.*, 1993). À eux seuls, les *Streptococcus* du groupe B (SGB) et les souches de *Escherichia coli* causant la méningite néonatale (NMEC) sont responsables de 70 à 80 % des cas de méningite du nouveau-né. On rencontre environ deux cas causés par des SGB pour chaque cas où une NMEC a été trouvée responsable (May *et al.*, 2005). Au travers des NMEC, on retrouve une très faible diversité de sérogroupes O et environ 80 % des souches ont une capsule K1 (Glode *et al.*, 1977; Kaper *et al.*, 2004).

Peu de facteurs prédisposants ont été identifiés à ce jour. Il a par contre été observé que les enfants naissants prématurément et qui ont un faible poids rencontrent un plus grand risque d'être atteints d'une méningite. Les nouveau-nés qui doivent subir une chirurgie dans leurs premiers jours de vie sont aussi plus à risque de développer la maladie. C'est bien souvent des chirurgies liées aux anomalies du tube neural qui ont été associés à des cas de méningite néonatale. On a également associé les anomalies du tractus urinaire à certains cas de méningite, une ITU compliquée pouvant donc être la porte d'entrée de pathogènes causant la méningite (Unhanand *et al.*, 1993).

En général, le tractus intestinal des enfants qui développeront une méningite à *E. coli* se fait coloniser par une souche NMEC à partir de la flore de leur mère ou bien de l'environnement auquel ils sont confrontés dès leurs premiers jours de vie. La première des trois principales étapes de l'infection est le passage des pathogènes de l'intestin vers la circulation sanguine (Glode *et al.*, 1977). Il arrive, à l'occasion, que le sang du fœtus soit infecté au cours de la grossesse lorsque la mère est victime d'une bactériémie. Dans



près d'un cas sur cinq, le passage vers la circulation sanguine se fait plutôt via le tractus urinaire (Bonacorsi et Bingen, 2005). Par contre, dans la majorité des cas de méningite néonatale, cette première étape se fait directement par translocation (Glode *et al.*, 1977). Les bactéries prolifèrent à l'excès et lorsqu'elles atteignent une densité d'au moins  $10^8$  UFC par gramme de fèces, elles peuvent effectuer une translocation au travers des cellules épithéliales (Berg, 1995).

Lors de la deuxième étape de l'infection, non seulement les bactéries réussissent à survivre dans le sang, mais elles s'y multiplient rapidement et une importante bactériémie est observable. Lorsqu'un seuil d'au moins  $10^3$  UFC/mL de sang est atteint, l'infection passe à sa troisième et dernière étape qui consiste à traverser la barrière hématoencéphalique (BHE) et envahir le système nerveux central (SNC) (Kim *et al.*, 1992; Pluschke *et al.*, 1983b). Pour ce faire, les bactéries doivent d'abord adhérer aux cellules endothéliales des microvaisseaux de cerveau (HBMEC), cellules qui forment la BHE en question. Cette adhérence se fait grâce à plusieurs facteurs adhérents fimbriaires et afimbriaires, le plus important pour ce phénomène étant les fimbriae de type 1 (Kim, 2003; Teng *et al.*, 2005; Xie *et al.*, 2004). Suite à une adhérence bien établie, plusieurs constituants bactériens, tel que la capsule et des protéines membranaires, interagissent avec des protéines cellulaires de l'hôte, provoquant un réarrangement du cytosquelette des HBMEC, ce qui donnera lieu à la transcytose des bactéries (Kim *et al.*, 1992; Xie *et al.*, 2004). Une fois dans le SNC, les bactéries se multiplient et ont un effet toxique et proinflammatoire dans les méninges, ce qui cause alors la perméabilisation de la BHE aux globules blancs. La méningite est alors établie et on peut observer de la pléocytose, de l'œdème et une hausse de la pression intracrânienne (Kim, 2003; Xie *et al.*, 2004).

## **1.5 Les souches pathogènes aviaires (APEC)**

Une multitude de souches de *E. coli* peuvent causer une panoplie d'infections chez un très large spectre d'hôtes animaux. Différentes souches de *E. coli* peuvent causer des infections intestinales ou systémiques chez les bovins, les porcins et les ovins. Ces infections touchent surtout les jeunes animaux mais peuvent aussi infecter les adultes (Fairbrother *et al.*, 2005; Gay, 1965; Hodgson, 1994). Certaines infections sont parfois aussi observées chez les lapins, les chats, les chiens, les chèvres et les chevaux (Peeters,

1994). D'autres souches causent une variété d'infections chez différentes espèces de volaille et on les nomme *E. coli* pathogènes aviaires (APEC). Par souci de garder ce mémoire concis, parmi toutes les souches infectant les animaux, seul le groupe des APEC sera discuté plus en détails ici.

Le groupe des APEC se distingue des autres groupes abordés jusqu'à présents puisqu'il cible principalement la volaille plutôt que l'homme. Par contre, les APEC et les ExPEC humains possèdent énormément de facteurs de virulence en commun et l'on croit même que certaines souches APEC pourraient causer des infections chez l'homme (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005). Les APEC comportent un important nombre de souches avec une diversité génétique étendue, mais il a été démontré que la majorité d'entre elles proviennent d'un nombre limité de lignées clonales (White *et al.*, 1993). De plus, on remarque que certains sérogroupes tels que O1, O2 et O78 sont rencontrés plus fréquemment que d'autres (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

La colibacillose aviaire est le nom en général donné aux infections causées par *E. coli* chez des espèces de volaille (White *et al.*, 1993). Les différentes infections causées par les APEC chez différentes espèces de volaille comme par exemple le poulet, la dinde et le canard sont nombreuses, mais sont principalement extra-intestinales. Des animaux de tous les stades de vies peuvent être infectés, de l'embryon dans l'œuf à l'animal adulte. Certaines maladies causées par des APEC peuvent faire de véritables ravages dans certains élevages et entraîner d'importantes pertes économiques (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

### **1.5.1 L'aérosacculite et ses complications**

Bien souvent, c'est le tractus respiratoire qui sert de porte d'entrée aux souches APEC. Leur tractus digestif étant le principal réservoir de souches APEC, il suffit que les animaux perturbent leur litière en s'agitant pour qu'une quantité importante de bactéries se retrouvent en suspension dans l'air qu'ils respirent (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994; La Ragione et Woodward, 2002). L'infection des sacs aériens se nomme l'aérosacculite. Lorsqu'un animal est infecté, on observe généralement des symptômes de dépression, une forte fièvre ainsi qu'une perte d'appétit se traduisant bien souvent par une importante perte de poids (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

De plus, l'aérosacculite est une maladie qui peut dégénérer facilement puisque les risques de complications telles que la septicémie, la périhépatite, la péritonite ou la péricardite sont très élevés. D'importantes lésions et pertes de fonction sont alors observées au niveau des organes ciblés. Chez les femelles en période de ponte, il est possible que l'oviducte soit infecté, causant alors une salpingite qui risque fort d'empêcher l'animal de pondre des œufs. Le taux de mortalité d'environ 20 % et la faible valeur sur le marché des animaux malades survivants entraînent des pertes économiques importantes aux producteurs lorsqu'un élevage entier est touché par l'aérosacculite et ses complications (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

Les souches APEC arrivent par contre rarement à infecter les animaux sains, car leurs défenses normales devraient protéger efficacement le tractus respiratoire. Ce sont donc particulièrement les individus déjà affaiblis par des stress environnementaux ou par des infections virales, mycoplasmiques ou bactériennes qui sont susceptibles à ces infections (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994). *Mycoplasma gallisepticum* est l'un des agents infectieux qui infectent le plus fréquemment les élevages de volaille et qui est un facteur qui prédispose les animaux aux infections par les APEC. Comme on connaît les facteurs prédisposant majeurs, il est possible de contrôler l'incidence de l'aérosacculite et de ses complications, notamment en améliorant les systèmes d'alimentation et de ventilation des poulaillers ainsi qu'en contrôlant les autres pathogènes par la vaccination, la prévention et par l'isolement et le traitement des animaux tout de même infectés. Malgré ces mesures connues, beaucoup d'élevages de volaille sont encore très mal entretenus et les APEC sont encore aujourd'hui une menace importante pour l'industrie avicole (La Ragione et Woodward, 2002).

### **1.5.2 L'infection de la membrane vitelline**

Même les embryons en période d'incubation dans l'œuf peuvent être victimes d'une infection par une souche APEC. La plus importante cause est la contamination fécale de la coquille de l'œuf. Si cette coquille est faible, endommagée, tiède et/ou mouillée, la pénétration des microorganismes sera facilitée. Il arrive plus rarement que l'œuf soit contaminé avant même d'être pondu si la mère est victime d'une infection des ovaires ou des oviductes (Gross, 1994; La Ragione et Woodward, 2002). En général, très

peu d'embryons survivent à une infection de la membrane vitelline, mais certains poussins peuvent tout de même éclore. Par contre, ces derniers risquent fort d'avoir de graves séquelles et de succomber à l'infection dans les trois semaines suivant leur naissance (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994).

### **1.5.3 Le syndrome de la tête enflée (SHS)**

Le syndrome de la tête enflée est une maladie de la dinde causée par *E. coli* mais qui nécessite une infection primaire par un ou plusieurs virus (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994). Les animaux atteints subissent un important œdème gélatineux au niveau du visage, particulièrement en périphérie des yeux, ainsi que des écoulements caséux au niveau des sacs lacrymaux et conjonctifs. Le taux de mortalité des animaux victime du SHS est d'environ 3 à 7 % (Nunoya *et al.*, 1991).

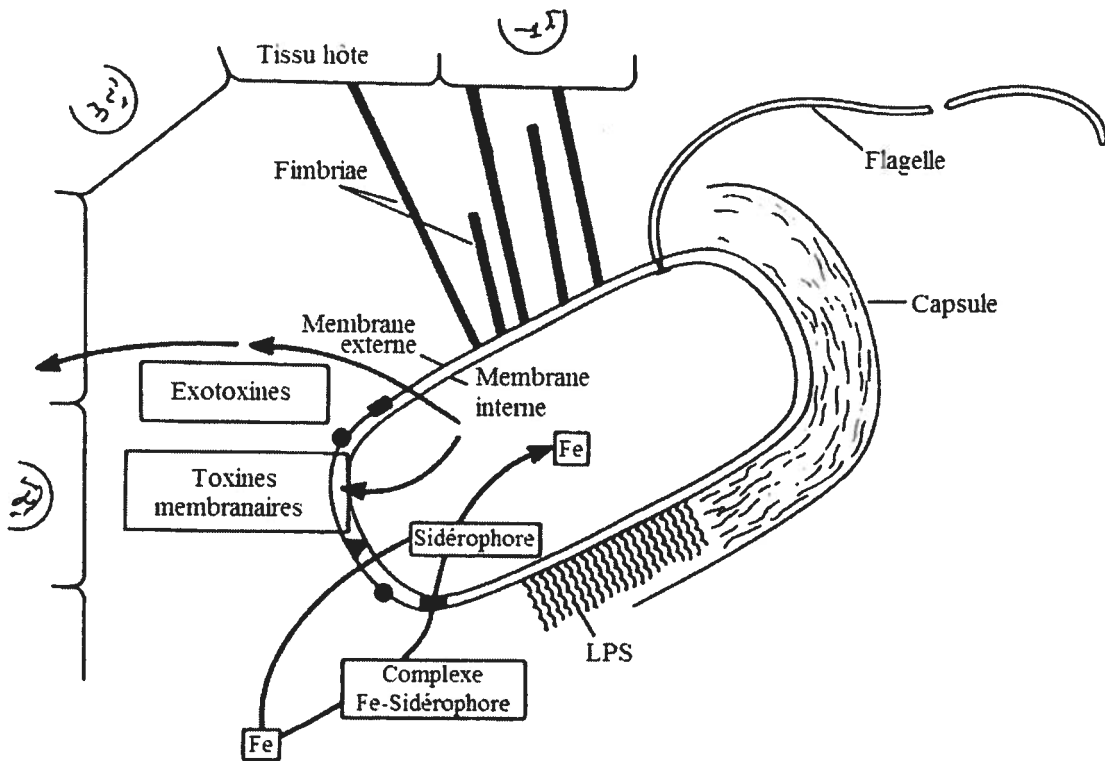
### **1.5.4 La cellulite aviaire**

La cellulite aviaire est une dermatite causant des plaques de fibrine sous-cutanées sur les cuisses et sur la région inférieure de l'abdomen. Cette condition n'est pas fatale pour les animaux, mais elle leur retire toute valeur commerciale. La cellulite aviaire est d'ailleurs, au Canada, la première cause de rejet des carcasses de volaille pour la consommation, entraînant des pertes économiques d'importance (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Stocki *et al.*, 2002).

## **1.6 Facteurs de virulences retrouvés chez les ExPEC**

On retrouve, dans le grand groupe des ExPEC, une panoplie de facteurs de virulence. Malgré le fait que les souches des différents sous-pathotypes doivent envahir des niches anatomiques différentes, elles utilisent généralement des stratégies similaires requérant donc très souvent les mêmes facteurs de virulence. De plus, certains de ces facteurs de virulence sont pratiquement spécifique aux ExPEC, ils sont donc rarement retrouvés chez les souches de *E. coli* causant des pathologies au niveau intestinal (Russo et Johnson, 2003). Parmi les plus importants facteurs de virulence, on retrouve diverses toxines sécrétées et membranaires, quelques systèmes d'acquisition du fer, des mécanismes d'évitement des défenses de l'hôte et plusieurs adhésines. Les principaux facteurs de virulence ExPEC sont illustrés à la **Figure 1.3** (Russo et Johnson, 2000).

Les gènes de virulence peuvent être retrouvés autant sur des plasmides que sur le chromosome bactérien. Il existe donc certains plasmides et familles de plasmides reconnus pour supporter majoritairement des facteurs de virulence. Les plasmides faisant partie de la famille ColV sont des exemples de plasmides de virulence très étudiés et rependus surtout chez les APEC et chez certaines autres souches ExPEC. Ces plasmides transférables, de grande taille et à faible nombre de copies forment une famille de plasmides plutôt hétérogène. Ils se sont d'abord fait attribuer leur nom d'après un groupe de gènes qu'ils portent, soit les gènes codant pour la colicine V, une toxine antibiotique (Waters et Crosa, 1991). Par la suite, une multitude d'autres facteurs de virulence tels que des systèmes d'acquisition du fer et de résistance au sérum ainsi que des adhésines, ont été associés à ces plasmides (Braun, 1981; Clancy et Savage, 1981; Waters et Crosa, 1991).



**Figure 1.3** Représentation des facteurs de virulence présents chez les ExPEC.

Sont représentés sommairement ici les principaux facteurs de virulence fréquemment retrouvés chez les différents sous-pathotypes d'ExPEC et qui seront décrits en détails dans les sections qui suivent (modifiée de Johnson, 1991).

Pour ce qui est des gènes de virulence chromosomiques, on en retrouve un peu partout sur le chromosome, mais on les retrouve en plus forte concentration dans des régions particulières du chromosome appelées îlots de pathogénicité (PAI). Ces régions d'environ 10 à 200 kb ont généralement un contenu en G+C différent du reste du chromosome et peuvent être transmises par transfert horizontal. Les gènes retrouvés sur ces PAI codent pour des protéines qui donnent un avantage compétitif à la bactérie ou qui sont impliquées dans des activités métaboliques secondaires, dans la résistance à certains antibiotiques ou bien directement dans la pathogénèse. Chez les ExPEC, les principaux facteurs de virulence retrouvés sur des PAI sont des adhésines, des toxines et des systèmes d'acquisition du fer (Hacker et Kaper, 2000). On peut donc en déduire que la transmission de PAI a grandement contribué à l'évolution des ExPEC ainsi que de beaucoup d'autres pathogènes (Dozois et Curtiss, 1999).

## **1.6.1 Les toxines**

### **1.6.1.1 Les hémolysines**

Seulement de 5 à 10 % des isolats fécaux de *E. coli* peuvent produire des hémolysines tandis que 40 à 50 % des ExPEC humains en sont capable (Bhakdi *et al.*, 1988). L' $\alpha$ -hémolysine est sans aucun doute la mieux connue des hémolysines et la plus répandue parmi les ExPEC (Beutin, 1991). Aussi appelée HlyA, l' $\alpha$ -hémolysine est une protéine de 110 kDa dépendante du calcium et sécrétée par un système de sécrétion de type 1 (Bhakdi *et al.*, 1988; Boehm *et al.*, 1990; Short et Kurtz, 1971; Wiles *et al.*, 2008). L'hémolysine traverse donc les deux membranes bactériennes, sans subir de modifications, à l'aide de HlyB, HlyD et TolC, respectivement un transporteur de type ABC, une protéine de fusion de la membrane et une protéine formatrice de pores de la membrane externe (Henderson *et al.*, 2004). Une fois sécrétée, lorsqu'elle entre en contact avec la membrane d'un érythrocyte, l' $\alpha$ -hémolysine a la capacité d'y former des pores d'environ 2 nm, ce qui entraîne inévitablement la lyse de la cellule (Bhakdi *et al.*, 1986). En plus de lyser des érythrocytes, HlyA peut causer des dommages cytolytiques à d'autres types de cellules tels que les leucocytes polymorphonucléaires, les monocytes et les granulocytes, compromettant alors les défenses de l'hôte (Johnson, 1991). Les souches produisant l' $\alpha$ -hémolysine sont généralement associées avec les infections les

plus sévères (Bhakdi *et al.*, 1988; Henderson *et al.*, 2004; Johnson, 1991). Pour ce qui est des APEC, seule une faible proportion de ces souches sécrètent des hémolysines et dans les rares cas où l'on en retrouve, ces hémolysines ont très peu d'homologie avec celles fréquemment produites par les souches ExPEC pathogènes pour les humains (Blanco *et al.*, 1997; Reingold *et al.*, 1999).

### **1.6.1.2 Le facteur cytotoxique nécrosant type 1 (CNF1)**

C'est en 1983 que le facteur cytotoxique nécrosant type 1 a été isolé et caractérisé. Ses effets cytotoxique et nécrosant sur des cellules en culture et sur de la peau de lapin lui ont valu son nom (Caprioli *et al.*, 1983). Le CNF1 est en fait une toxine bactérienne de 113,7 kDa exprimée chez *E. coli* par certaines souches pathogènes intestinales, par environ 7 à 10 % des NMEC, ainsi que par plus du tiers des UPEC (Bonacorsi *et al.*, 2003; Falbo *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 2002; Landraud *et al.*, 2000). Le CNF1 active les GTPases Rho chez des cellules de son hôte. Par cette activation, les protéines Rho sont activées en permanence, causant la perturbation de divers mécanismes cellulaires. Les principaux effets directs sont une forte production d'une pléiade d'immunomodulateurs ainsi qu'une importante réorganisation du cytosquelette d'actine menant à la formation de cellules géantes multinuclées (Lemonnier *et al.*, 2007).

### **1.6.1.3 Les toxines de type autotransporteur**

Les autotransporteurs sont des protéines qui, à elles seules, possèdent tous les éléments nécessaires pour en arriver à se transporter soi-même de l'autre côté de la membrane externe. Ces protéines sont guidées vers la membrane interne par un peptide signal. Ils la traversent ensuite grâce à une machinerie de type Sec. Une fois dans le périplasme, le peptide signal est clivé et le domaine- $\beta$  de la protéine s'insère dans la membrane externe pour y former un pore. Le domaine fonctionnel de la protéine est alors transloqué vers l'extérieur et peut ensuite être clivé ou non pour devenir une protéine sécrétée ou membranaire. Dans la famille des autotransporteurs, on retrouve des protéines possédant une multitude de fonctions différentes telles que des toxines, des protéases, des adhésines et des invasines. Parmi les toxines de type autotransporteur, deux sont bien représentées chez les ExPEC, soit les toxines Vat et Sat (Henderson *et al.*, 2004).

La protéine de type autotransporteur Vat est une toxine vacuolante exprimée par environ 42 % des souches UPEC, 33 % des souches APEC et par quelques souches MNEC (Parham *et al.*, 2005; Parreira et Gyles, 2003; Restieri *et al.*, 2007). Cette toxine de 111,8 kDa a été isolée et caractérisée à partir d'une souche APEC en 2003. On lui attribue une activité cytotoxique vacuolante sur des fibroblastes embryonnaires de poulet en culture. Une souche APEC exprimant Vat est particulièrement invasive et peut causer d'importantes lésions au péricarde et au foie chez la majorité des poulets infectés, autant dans un modèle d'infection respiratoire-septicémique que dans un modèle de cellulite. Vat est sans aucun doute relié à la virulence puisqu'un mutant  $\Delta vat$  d'une souche pathogène APEC (Ec222) perd toute sa capacité d'infecter dans les deux modèles classiques d'infection aviaire (Parreira et Gyles, 2003).

Sat est une toxine sécrétée de 107 kDa qui, tout comme Vat, fait partie de la famille des autotransporteurs (Guyer *et al.*, 2000). On la retrouve chez plus de la moitié des souches UPEC, mais elle est absente chez les APEC (Restieri *et al.*, 2007). Sat est une sérine protéase qui a des effets cytopathiques sur des cellules de vessies et de reins en culture. Les dommages sont particulièrement marquants sur les tissus de reins où l'on observe la formation de vacuoles. Dans un modèle *in vivo* d'infection du tractus urinaire murin, on observe une dissolution presque complète de la membrane des glomérules ainsi qu'une importante réponse inflammatoire. L'association de Sat avec les souches les plus virulentes causant des ITU ainsi que ses effets sur les tissus permettent d'affirmer que Sat contribue grandement à la virulence des ExPEC (Guyer *et al.*, 2000; Guyer *et al.*, 2002; Maroncle *et al.*, 2006).

### **1.6.2 Les systèmes d'acquisition du fer**

Le fer est un élément essentiel à pratiquement toutes formes de vie. Chez les bactéries, le fer joue un rôle clé dans plusieurs processus biologiques tels que la gestion de l'hydrogène et de l'oxygène, la fixation de l'azote, la production de méthane et la régulation et biosynthèse des acides nucléiques. Étant donné que le fer dans sa forme utilisable est plutôt rare dans les organes généralement touchés par les ExPEC ainsi que dans le sang, les bactéries ont développé plusieurs stratégies afin de se procurer ce métal



si précieux en quantités suffisantes. Largement employée par les ExPEC, l'utilisation de sidérophores est l'une de ses stratégies (Andrews *et al.*, 2003).

Les sidérophores sont des molécules à faibles poids moléculaires ayant une forte affinité pour le fer et qui sont sécrétés dans le milieu extracellulaire par les bactéries dans le but d'aller séquestrer des molécules de fer. Une fois couplés à une molécule de fer, les sidérophores sont récoltés par les bactéries afin que ces dernières puissent utiliser le fer capturé, tel que schématisé à la **Figure 1.3** (Faraldo-Gomez et Sansom, 2003; Koster, 2001). Il est généralement impossible pour beaucoup d'ExPEC de coloniser leur site d'infection sans l'utilisation de sidérophores, ces molécules sont donc considérées comme étant des facteurs de virulence (Andrews *et al.*, 2003; Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

#### **1.6.2.1 L'aérobactine**

L'aérobactine est un sidérophore présent chez 98 % des APEC causant la septicémie chez le poulet et chez environ de 40 à 75 % des ExPEC humains (Dozois *et al.*, 1992; Johnson, 1991; Johnson *et al.*, 2002; Montgomerie *et al.*, 1984). L'aérobactine est une molécule de type hydroxamate qui est codée par les gènes *iucABCD*. Le transporteur impliqué dans l'import du complexe fer-aérobactine est quant à lui codé par le gène *iutA*. Les gènes *iuc* et *iut* sont généralement retrouvés sur le plasmide ColV mais peuvent aussi être situés sur le chromosome (Bagg et Neilands, 1987; Braun, 1981; Valvano et Crosa, 1984). À pH neutre, l'aérobactine est sans doute le sidérophore le plus efficace, le plus soluble et le plus stable (Bagg et Neilands, 1987; de Lorenzo et Martinez, 1988). Chez les APEC et les UPEC, on a observé une corrélation directe entre la présence d'aérobactine et la virulence des souches (Dozois *et al.*, 2003; Lafont *et al.*, 1987; Montgomerie *et al.*, 1984; Williams et Warner, 1980).

#### **1.6.2.2 L'entérobactine**

D'abord isolée en 1970 chez *E. coli* et chez *Salmonella typhimurium*, l'entérobactine est un petit sidérophore de type catécholate qui possède une constante d'affinité pour le fer exceptionnellement élevée et qui est retrouvée chez un très grand éventail de souches pathogènes et commensales (Harris *et al.*, 1979; O'Brien *et al.*, 1970; Pollack et Neilands, 1970; Wiles *et al.*, 2008). Malgré sa constante d'affinité élevée pour

le fer, l'entérobactine n'est pas plus efficace que l'aérobactine *in vivo*, puisque son efficacité diminue à pH neutre et dans les liquides physiologiques tels que dans le sérum ou en présence d'albumine (Bagg et Neilands, 1987; de Lorenzo et Martinez, 1988; Williams et Carbonetti, 1986). On sait aussi que contrairement à l'aérobactine, l'entérobactine est susceptible d'être séquestrée par des protéines de l'hôte tel que les lipocalins, empêchant alors sa recapture par les bactéries (Goetz *et al.*, 2002).

La synthèse de l'entérobactine est effectuée grâce aux gènes *entABCDEF* et c'est le transporteur EntS qui permet ensuite son exportation. Une fois le sidérophore couplé à une molécule de fer, il est recapturé grâce à un transporteur ABC codé par les gènes *fepABCDG*. Le complexe fer-entérobactine est alors dégradé par l'estérase Fes pour permettre à la bactérie d'utiliser la molécule de fer ainsi récoltée (Crosa et Walsh, 2002).

Puisque l'entérobactine est un élément clé dans l'acquisition *in vivo* de fer, métal essentiel à la survie des bactéries, on considère ce sidérophore comme étant un facteur de virulence. À cet effet, plusieurs expériences ont été réalisées dans différents modèles afin de démontrer la contribution de l'entérobactine à la virulence (Kochan *et al.*, 1977).

### 1.6.2.3 Les salmochélines

Les salmochélines sont une famille de sidérophores de type catécholate dont les membres sont des dérivés de l'entérobactine ayant subi différentes modifications telles que la glycosylation et l'hydrolyse de certains liens ester linéarisant alors la molécule cyclique (Bister *et al.*, 2004; Hantke *et al.*, 2003). Ces modifications ont lieu grâce à des enzymes codées par les gènes *iroBDE*. Les salmochélines sont ensuite exportées puis importées respectivement par le produit des gènes *iroC* et *iroN* (Caza *et al.*, 2008; Hantke *et al.*, 2003). IroD aurait aussi un rôle jouer dans la dégradation des salmochélines afin de leur permettre de relâcher la molécule de fer préalablement séquestrée dans le milieu intracellulaire (Caza *et al.*, 2008; Lin *et al.*, 2005).

Les modifications apportées à l'entérobactine donnent certains avantages aux salmochélines. Par exemple, la glycosylation augmente la solubilité et la stabilité de ces sidérophores dans les conditions physiologiques (Smith, 2007). De plus, cette modification permet aux salmochélines d'éviter la séquestration par les lipocalins, protéine de défense de l'hôte qui peut séquestrer l'entérobactine (Fischbach *et al.*, 2006).

Les salmochélines sont fortement associées aux infections par les APEC et par les ExPEC humains (Bonacorsi *et al.*, 2003; Johnson *et al.*, 2002; Wiles *et al.*, 2008). Grâce à différentes expériences *in vivo* dans plusieurs modèles animaux, il a été démontré que les salmochélines sont nécessaires à la virulence des APEC, des UPEC et des MNEC (Caza *et al.*, 2008; Dozois *et al.*, 2003; Negre *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2002).

### **1.6.3 La résistance au sérum**

La résistance au sérum sanguin et au complément qu'il contient est une caractéristique bactérienne qui implique plusieurs facteurs. On connaît plutôt bien l'implication des polysaccharides, tels que la capsule et le LPS, dans ce phénomène. Ces polysaccharides ne sont par contre pas les seuls à défendre les bactéries contre les effets bactéricides du sérum. Certaines protéines membranaires telles que TraT et Iss contribuent aussi à cette résistance. La capacité de résister au sérum est une caractéristique rependue chez les ExPEC et les souches qui la possèdent font généralement partie des plus virulentes (Ewers *et al.*, 2007; Johnson, 1991; Kim *et al.*, 2003; Mellata *et al.*, 2003a; Pluschke *et al.*, 1983a; Taylor, 1983).

#### **1.6.3.1 Les polysaccharides**

##### **1.6.3.1.1 La capsule**

Chez *E. coli*, on retrouve plus de 80 types de capsules de polysaccharides. Tel qu'illustré à la **Figure 1.3**, ces enveloppes recouvrent la surface des bactéries, interférant alors avec la détection par le système immunitaire de l'hôte de certains antigènes de surface. Elles sont généralement composées d'une répétition de sous-unités de carbohydrates formant des polymères linéaires. On y retrouve parfois aussi certains acides aminés ou composés lipidiques (Johnson, 1991; Whitfield et Roberts, 1999).

Chaque type de capsule a une composition et des caractéristiques qui lui sont propres, mais c'est la capsule K1 qui est la plus rependue chez les ExPEC et qui est le plus fréquemment associée à la virulence de ces souches (Bliss *et al.*, 1996). Cette capsule est reconnue pour avoir un effet protecteur contre le complément du sérum et contre la phagocytose par les cellules polymorphonucléaires. De plus, la capsule K1 est

très peu immunogène, ce qui aide les pathogènes qui la produisent à passer inaperçu (Gross, 1994; Nataro et Levine, 1994; Van Dijk *et al.*, 1979).

Les souches MNEC sont les souches les plus fortement associées avec le type capsulaire K1. Dans les cas de méningites néonatales, la capsule K1 joue un rôle essentiel dans la virulence car elle augmente le taux de survie des bactéries dans les HBMEC et facilite l'invasion de phagocytes. De plus, cette capsule protège les bactéries du complément ainsi que des bactériophages, leur conférant alors un avantage compétitif supplémentaire (Kim *et al.*, 2003).

L'éventail de types capsulaires est un peu plus large chez les UPEC, mais on sait tout de même que les souches arborant une capsule K1 sont les plus abondantes et ce sont généralement des souches qui possèdent un important arsenal de facteurs de virulence en plus de leur capsule K1 (Ewers *et al.*, 2007). Dans le modèle d'infection du tractus urinaire murin, la synthèse d'une capsule de polysaccharides contribue grandement à la virulence des souches (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

Chez les APEC, ce sont les capsules K1 et K80 qui dominent, mais c'est encore une fois la première qui est plus souvent associée à la virulence (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999; Gross, 1994). Les souches APEC exprimant une capsule K1 sont par ailleurs beaucoup plus résistantes aux effets bactéricides du sérum que les souches arborant d'autres types de capsule ou aucune capsule (Mellata *et al.*, 2003a; Pourbakhsh *et al.*, 1997a). De plus, la production d'une capsule K1 permet aux APEC d'éviter la phagocytose par les hétérophiles et les macrophages (Mellata *et al.*, 2003b).

#### **1.6.3.1.2 Le lipopolysaccharide**

Tel que discuté brièvement dans la section 1.2.1, le LPS est un constituant de la membrane externe des bactéries Gram-négatives. Il est constitué d'un lipide A, d'un polysaccharide central et d'une chaîne latérale O qui peut varier d'une souche à l'autre et qui détermine, chez *E. coli*, l'antigène O du sérotype. Les différents rôles du LPS ne sont pas tous directement liés à la virulence. Le polysaccharide central participe à maintenir la surface bactérienne chargée négativement et le lipide A étant ancré profondément dans la membrane externe, contribue à solidifier et stabiliser sa structure (Prescott *et al.*, 2003).

En plus de remplir leurs fonctions de base, certains types de LPS contribuent à la virulence des souches en permettant de résister aux effets bactéricides du sérum. Ce sont les souches possédant les antigènes O6, O7, O18 et O50, qui sont les mieux protégées contre le complément, tandis que d'autres antigènes O laissent les bactéries totalement sensibles à son effet bactéricide (Hughes *et al.*, 1982; Johnson, 1991). Il a d'ailleurs été démontré qu'une souche K-12 tout à fait sensible au sérum y devient résistante après l'acquisition de l'antigène O18. Dans le même ordre d'idée, une souche pathogène résistante qui perd son antigène O18 deviendra sensible aux effets bactéricides du sérum (Johnson, 1991; Pluschke *et al.*, 1983a).

Sachant que les souches sensibles et résistantes permettent un taux similaire d'activation du complément, on en déduit que le LPS n'interfère pas avec cette étape de la cascade du complément. Ce dernier pourrait par contre provoquer l'activation du complément à une distance plus éloignée de la membrane, la protégeant alors du même coup du complexe d'attaque membranaire (CAM) du complément. Il est aussi possible que le LPS contribue à protéger la bactérie des effets du sérum en diminuant la fluidité de la membrane, ce qui y rendrait plus difficile l'insertion du CAM et ainsi l'empêcherait d'entamer la lyse de la cellule. Ce mécanisme d'action expliquerait aussi pourquoi plus le LPS est abondant dans la membrane, plus l'effet protecteur est marqué (Goldman *et al.*, 1984; Taylor, 1983).

### **1.6.3.2 Les protéines membranaires**

#### **1.6.3.2.1 Iss**

La protéine Iss (*increased serum survival*) est codée par le gène *iss* qui est localisé sur certains plasmides de virulence de type ColV (Binns *et al.*, 1979; Nilius et Savage, 1984). L'expression de cette protéine membranaire peut rendre une bactérie beaucoup plus résistante aux dommages causés par le sérum que si elle ne l'exprimait pas. On ne connaît pas encore le mode d'action précis de Iss, mais on sait que la protéine interfère avec l'interaction entre le CAM du complément et la membrane externe, possiblement en empêchant un ou plusieurs des constituants du CAM à adhérer à la membrane (Binns *et al.*, 1982; Taylor, 1983).

#### 1.6.3.2.2 TraT

TraT est une protéine de 25 kDa présente en grande quantité au niveau de la membrane externe et dont une importante proportion de sa superficie est exposée vers l'extérieur de la cellule (Achtman *et al.*, 1977; Manning *et al.*, 1980). La région codante pour cette protéine est généralement véhiculée par des plasmides conjugatifs de grandes tailles tels que R100 et R6-5 et parfois par certains plasmides ColV (Binns *et al.*, 1982; Taylor, 1983). TraT aurait un mécanisme d'action contre l'action du complément similaire à celui de Iss, c'est-à-dire qu'il agirait sur l'interaction entre les constituants du CAM et la membrane externe de la bactérie qui l'exprime à sa surface (Binns *et al.*, 1982). En absence de capsule, même en petite quantité, la protéine TraT permet de protéger efficacement la bactérie contre le complément du sérum. Dans le cas d'une bactérie encapsulée, une concentration élevée de TraT est nécessaire pour observer son effet (Achtman *et al.*, 1977; Agüero *et al.*, 1984).

#### 1.6.4 Le flagelle

Le flagelle, tel que décrit dans la section 1.2.1 et schématisé à la **Figure 1.3**, est un organelle de motilité composé principalement d'un filament de flagelline, d'un corps basal et d'un crochet. Il est le moyen de déplacement le plus répandu chez les procaryotes motiles et est présent chez un grand nombre de souches de *E. coli* (Prescott *et al.*, 2003; Wright *et al.*, 2005).

Le flagelle peut permettre des déplacements pouvant aller jusqu'à environ 90  $\mu\text{m/s}$  (Prescott *et al.*, 2003). La motilité par le flagelle est possible grâce au mouvement de rotation de l'organelle et elle peut se faire de façon aléatoire ou elle peut être dirigée par un stimulus chimiotactique. Différentes molécules sont détectables par des chimiorécepteurs cytoplasmiques qui peuvent déclencher toute une cascade complexe de méthylation et de phosphorylation des protéines Che. Un signal est finalement transmis au moteur flagellaire afin qu'il dirige la bactérie vers les molécules attractives telles que des sucres ou autres nutriments, ou bien en direction opposée aux molécules répulsives comme des toxines (Macnab, 2003).

*In vivo*, il est connu que le flagelle permet l'enfoncement dans le mucus intestinal, lieu où les bactéries peuvent se nourrir et se répliquer tout en étant protégées. De plus, une fois le mucus traversé, les bactéries peuvent accéder aux cellules épithéliales de l'intestin et ainsi, leur adhérer. Ce contact initial peut devenir la première étape d'une infection invasive (Freter *et al.*, 1981).

En permettant aux bactéries de se déplacer vers les lieux les plus riches en nutriments, le flagelle contribue à augmenter les chances de survie de l'organisme. Par contre, dans le cadre des infections extra-intestinales, le flagelle a aussi un rôle à jouer dans la pathogénèse. Chez les UPEC, il a été trouvé possible d'établir une infection efficace dans la vessie et les reins par une souche n'exprimant pas de flagelle dans le modèle murin d'ITU ascendante. Par contre, des co-infections dans le même modèle d'infection ont prouvées que les bactéries flagellées avaient un avantage compétitif important dans l'établissement d'une ITU (Lane *et al.*, 2005). De plus, le groupe de Lane a réussi à visualiser l'expression de gènes flagellaires lors d'infection *in vivo* chez la souris grâce à la bioluminescence et à l'imagerie biophotonique. Leurs observations ont confirmé que le flagelle joue un rôle clé dans l'ascension des bactéries de la vessie vers les reins par les uretères lors d'une ITU (Lane *et al.*, 2007).

Un rôle important pour les flagelles dans l'établissement de la méningite néonatale par *E. coli* a récemment été démontré. En effet, cet organelle connu pour son rôle dans la motilité, participe à l'association et à l'invasion de cellules HBMEC en culture. *In vivo*, l'invasion des cellules HBMEC mènent à la traversé de la barrière hématoencéphalique, étape nécessaire à l'établissement de la méningite. Étant peu probable que la motilité soit en cause dans l'interaction avec les HBMEC, il a été suggéré que la flagelline, partie intégrante du flagelle, aurait des propriétés adhésives (Parthasarathy *et al.*, 2007).

Du côté des APEC, il a été déterminé grâce à différents modèles d'infections aviaires que le flagelle possède un rôle majeur dans la colonisation, l'invasion et la persistance lors de la colibacillose. Le flagelle serait donc autant impliqué dans les infections aviaires qu'humaines (La Ragione *et al.*, 2000).

### 1.6.5 Les adhésines

Les adhésines sont des structures de surface présentes chez les bactéries Gram-positives et Gram-négatives qui sont capables de lier un ou plusieurs récepteurs complémentaires retrouvés sur des cellules hôtes. On en retrouve une importante variété de structures différentes avec une affinité pour un grand nombre de récepteurs (Ofek *et al.*, 2003).

Puisque habituellement les adhésines permettent une adhérence spécifique à différents récepteurs retrouvés sur une variété de types cellulaires et de tissus, les souches infectant différentes niches anatomiques n'arborent pas toutes les mêmes combinaisons d'adhésines. On retrouve d'ailleurs les principales adhésines d'importance exprimées par les différents pathotypes ExPEC dans le **Tableau 1.2**.

**Tableau 1.2** Adhésines d'importance selon les différents pathotypes ExPEC.

Adhésines	UPEC	MNEC	APEC	Références	
Fimbriaire	AC/I		✗	(Yerushalmi <i>et al.</i> , 1990)	
	Curli		✗	(La Ragione <i>et al.</i> , 1999)	
	Dr	✗		(Foxman <i>et al.</i> , 1995)	
	FIC	✗		(Siitonen <i>et al.</i> , 1993)	
	P	✗	✗	✗	(Brauner <i>et al.</i> , 1985; Dozois <i>et al.</i> , 1992; Johnson <i>et al.</i> , 2002)
	S	✗	✗		(Korhonen <i>et al.</i> , 1985; Ott <i>et al.</i> , 1986)
	Stg			✗	(Lymberopoulos <i>et al.</i> , 2006)
	Type 1	✗	✗	✗	(Connell <i>et al.</i> , 1996; Marc <i>et al.</i> , 1998; Teng <i>et al.</i> , 2005)
Afinmbriaire	Afa	✗		(Foxman <i>et al.</i> , 1995)	
	Iha	✗		(Johnson <i>et al.</i> , 2005; Leveille <i>et al.</i> , 2006)	
	NFA	✗		(Foxman <i>et al.</i> , 1995)	
	Tsh	✗		✗	(Dozois <i>et al.</i> , 2000; Heimer <i>et al.</i> , 2004; Provence et Curtiss, 1994)



### 1.6.5.1 Les adhésines fimbriaires

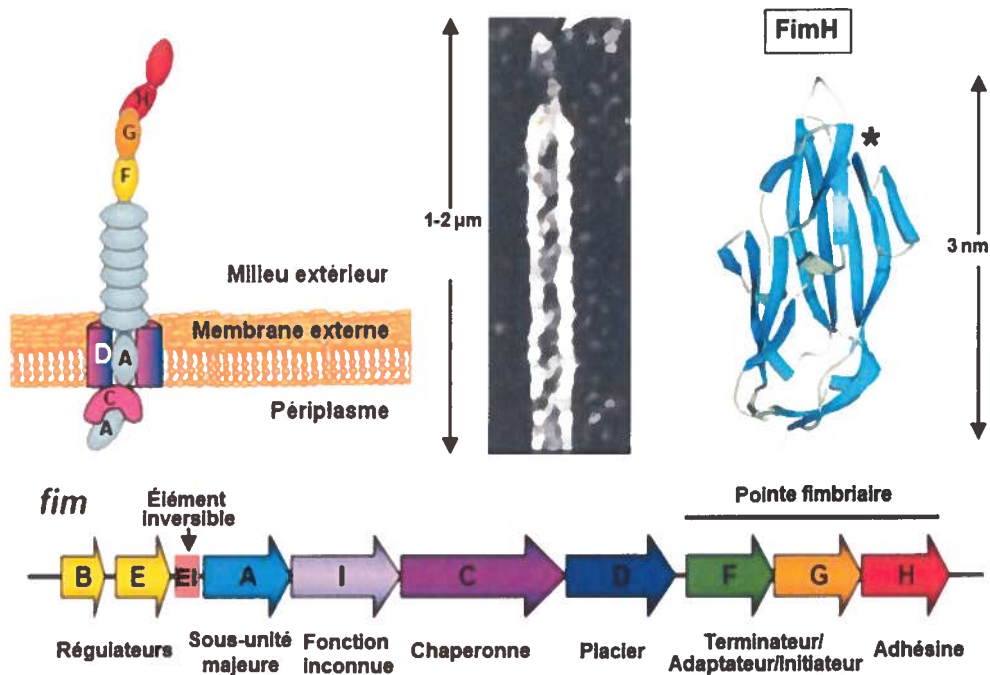
Une grande proportion des structures adhésives bactériennes font partie de la famille des fimbriae. Ces organelles ont une structure filamenteuse définie composée d'une quantité variable de sous-unités identiques ou différentes et sont généralement visibles par microscopie électronique. Contrairement aux flagelles, les fimbriae sont relativement courts et étroit, mais peuvent être retrouvés en très grand nombre à la surface des bactéries. Toutes les catégories de souches ExPEC utilisent, à un moment ou un autre de leur stratégie d'infection, un ou plusieurs fimbriae parmi ceux présentés ci-après (Le Bouguenec, 2005; Wiles *et al.*, 2008).

#### 1.6.5.1.1 Les fimbriae de type 1

Le fimbria de type 1 est l'adhésine la plus répandue chez l'ensemble des souches de *E. coli*, pathogènes ou non, ainsi que chez beaucoup d'autres espèces bactériennes Gram-négatives. Grâce à sa structure plutôt standard et à l'importance de son rôle dans l'adhérence à un grand nombre de tissus dans divers hôtes, il est considéré comme l'archétype des fimbriae (Abraham *et al.*, 1988; Jones *et al.*, 1995).

##### 1.6.5.1.1.1 Assemblage

Tel qu'illustré à la **Figure 1.4**, les fimbriae de type 1 sont constitués d'un filament hélicoïdal composé de 500 à 3000 sous-unités majeures appelées FimA (Hahn *et al.*, 2002; Klemm, 1984). Le bout des fimbriae retrouvé à l'extrémité du filament comporte les sous-unités accessoires FimF et FimG ainsi que l'adhésine FimH (Klemm et Christiansen, 1987). Les fimbriae de type 1 mesurent de 1 à 2  $\mu\text{m}$  de long et 7 nm de large (Klemm *et al.*, 1985). En plus des gènes *fimAFGH* codant pour les protéines de structures, l'opéron *fim*, aussi illustré à la **Figure 1.4**, contient aussi des régions qui seront discutées dans les paragraphes qui suivent, soit un élément inversible, les gènes de régulation *fimBE* ainsi que les gènes *fimCD* qui codent pour des protéines ayant un rôle au niveau du processus d'assemblage (Jones *et al.*, 1993; Klemm, 1986; Klemm et Christiansen, 1990; Wright et Hultgren, 2006). On y retrouve aussi le gène *fimI* qui semble être nécessaire à la biosynthèse des fimbriae mais dont la fonction précise est aujourd'hui toujours inconnue (Valenski *et al.*, 2003).

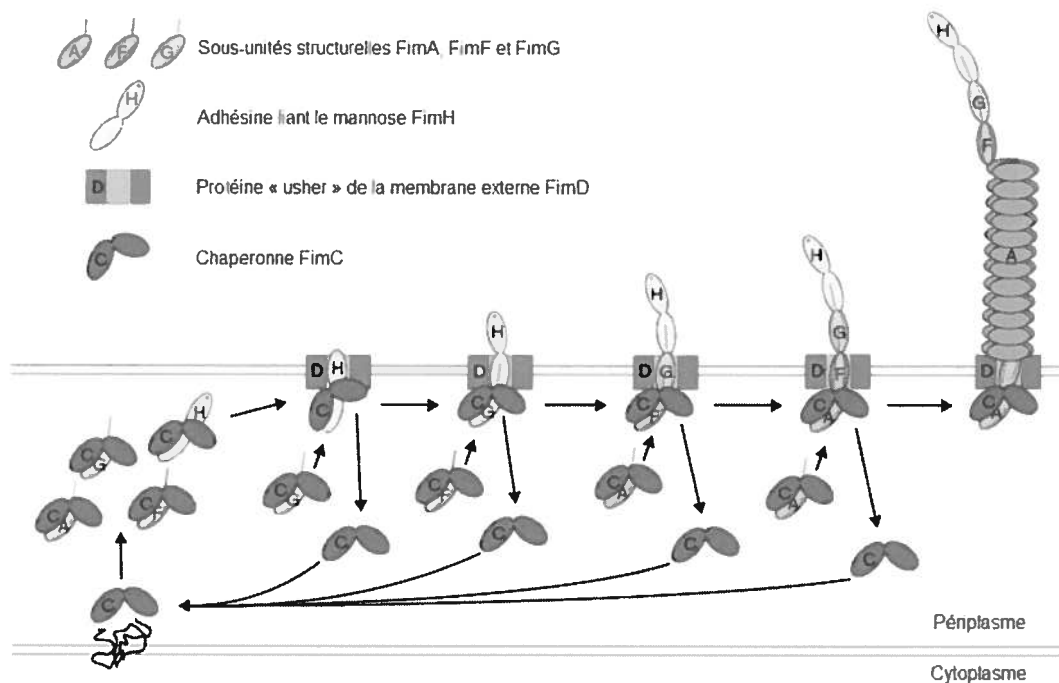


**Figure 1.4** Organisation génétique et représentations du fimbriae de type 1.

À gauche, on peut observer la structure schématisée du fimbriae de type 1 avec l'identification des différentes sous-unités. Au centre, une photo de microscopie électronique démontrant un fimbriae de type 1 où l'on peut observer que la pointe comprenant les sous-unités FimFGH est plus étroite que le filament. À droite on peut voir la structure tridimensionnelle de la sous-unité FimH avec sa pochette d'affinité pour le mannose représentée par un astérisque. On peut finalement voir, au bas de la figure, l'organisation génétique de l'opéron *fim* (adapté de Jones *et al.*, 1995; Mulvey, 2002 et Wright et Hultgren, 2006).

Tel que mentionné auparavant, FimH est la sous-unité qui occupe le rôle d'adhésine pour les fimbriae de type 1. On peut d'ailleurs observer sa structure tridimensionnelle à la **Figure 1.4**. FimH est constitué de deux domaines composés de feuillets- $\beta$  repliés l'un sur l'autre. Le domaine en C-terminal a une fonction structurelle et sert donc à lier la sous-unité accessoire FimG. En N-terminal on retrouve plutôt un domaine lectine qui a pour rôle la liaison aux récepteurs (Choudhury *et al.*, 1999). Cet attachement est possible grâce à une pochette de liaison à l'extrémité de ce domaine, représentée par l'astérisque dans la **Figure 1.4**, qui a la faculté d'accueillir une molécule de mannose. En général, les récepteurs des fimbriae de type 1 sont donc des molécules mannosylées à la surface de certains types cellulaires présents chez les différents hôtes (Hung *et al.*, 2002; Knight *et al.*, 2000). Les récepteurs spécifiques seront discutés plus en détails à la section 1.6.5.1.1.3.

L'assemblage des fimbriae de type 1 s'effectue via la voie nommée « chaperone-usher ». D'ailleurs, tous les fimbriae décrits dans la section 1.6.5.1, excepté les curli, sont assemblés de la même façon. Cette voie d'assemblage ne sera donc pas répétée dans les sections abordant les autres fimbriae concernés (Capitani *et al.*, 2006; Hammar *et al.*, 1996). L'assemblage des fimbriae de type 1 repose donc essentiellement sur la chaperone FimC et la protéine « usher » FimD (Jones *et al.*, 1993; Klemm et Christiansen, 1990). FimC est une protéine périplasmique qui a la capacité de se lier aux différentes sous-unités structurelles dans un ratio de 1:1. En plus de contribuer à l'achèvement du repliement de ces sous-unités, la chaperone empêche aussi les sous-unités de s'assembler prématurément (Jones *et al.*, 1993; Vetsch *et al.*, 2004). FimC a aussi le pouvoir de se lier à FimD, la protéine « usher » qui est localisée au niveau de la membrane externe et qui sert, à cette étape, de plateforme d'assemblage. Tel qu'illustré à la **Figure 1.5**, la chaperone FimC transmet ensuite les différentes sous-unités à FimD où



**Figure 1.5** Assemblage du fimbriae de type 1.

Schéma de l'assemblage par la voie « chaperone-usher » des différentes sous-unités composant le fimbriae de type 1. La chaperone FimC conduit les différentes sous-unités à la protéine « usher » membranaire FimD, où le fimbriae est assemblé. L'assemblage s'effectue dans l'ordre, de la pointe à la base, donc FimH est la première sous-unité à être assemblée (adapté de Knight *et al.*, 2000).

elles s'assemblent linéairement et sont transloquées vers la surface externe de la cellule en débutant par la pointe et en terminant par la base. Lorsque l'assemblage est terminé, la protéine FimD reste à la base des fimbriae, leur servant alors d'ancrage à la membrane externe (Capitani *et al.*, 2006; Jones *et al.*, 1993; Klemm et Christiansen, 1990; Saulino *et al.*, 2000).

#### 1.6.5.1.1.2 Expression et régulation

Le fimbria de type 1 est une adhésine qui est soumise à une variation de phase. Ce phénomène permet à différentes structures de surface de modifier, généralement de façon réversible, l'état de leur expression génétique. Dans certain cas, la variation de phase peut être pratiquement aléatoire et dans d'autres, elle est une réaction à différents événements. Elle peut se faire grâce à des mécanismes tels qu'une modification de l'état de méthylation d'une région génétique ou même, comme dans le cas des fimbriae de type 1, par une inversion réversible d'un segment d'ADN génomique (Adiciptaningrum *et al.*, 2009; Henderson *et al.*, 1999).

L'élément inversible (EI) qui permet la variation de phase des fimbriae de type 1 comporte 314 pb et contient la région codant pour le promoteur du gène *fimA*. Il peut adopter deux positions, c'est-à-dire la position ouverte, où le promoteur de *fimA* est dans le même sens que l'opéron, permettant alors à celui-ci d'être transcrit, ou la position fermée où la transcription est inactivée. Puisque ce type de variation de phase ne permet que deux états, on observera donc une situation de tout ou rien, c'est-à-dire que les fimbriae seront soit totalement exprimés, ou bien pas du tout exprimés. Dans ce cas-ci, puisque la structure pratiquant la variation de phase est une adhésine, le rôle de ce phénomène serait de favoriser l'adhérence dans les phases initiales d'établissement de l'infection et d'inhiber l'adhérence lorsque la bactérie a besoin de se déplacer si l'environnement est hostile ou s'il est temps de propager l'infection à d'autres sites. La variation de phase peut aussi permettre aux bactéries d'éviter de stimuler la réponse immunitaire de son hôte (Henderson *et al.*, 1999; van der Woude et Baumler, 2004; van der Woude, 2006).

Si l'on observe le schéma de l'opéron *fim* à la **Figure 1.4**, on constate que l'EI contenant le promoteur de *fimA* est bel et bien situé en amont du gène *fimA* et de tous les

autres gènes nécessaires à la structure et l'assemblage des fimbriae, ce qui permet une transcription efficace. On peut par contre remarquer que deux gènes *fim* précèdent l'EI, il s'agit de *fimE* et *fimB*. Ces gènes identifiés comme responsables de la régulation des fimbriae codent en fait pour des recombinases qui permettent entre autres à l'EI d'effectuer des inversions, mais qui peuvent aussi en influencer le sens, d'où l'implication dans la régulation (Abraham *et al.*, 1985; Henderson *et al.*, 1999; Klemm, 1986).

FimE et FimB sont des recombinases similaires qui ont 48 % d'identité mais qui diffèrent principalement sur un point important puisque FimB effectue des inversions de l'EI dans les deux sens alors que FimE préfère inverser l'EI de la position ouverte vers la position fermée. L'orientation globale de l'EI est donc déterminée par l'abondance relative des deux recombinases qui provoqueront plus d'inversions dans un sens que dans l'autre. Étant donné que les gènes *fimB* et *fimE* possèdent chacun un promoteur indépendant, il est possible d'influencer l'expression des fimbriae de type 1 en agissant sur le promoteur de l'une ou des deux recombinases (Gally *et al.*, 1996; Klemm, 1986; Kulasekara et Blomfield, 1999; van der Woude et Baumler, 2004).

L'une des protéines influençant la régulation des fimbriae de type 1 est H-NS, une protéine associée aux nucléotides ressemblant aux histones. Puisqu'elle a un rôle connu dans la régulation de la stabilité du génome, de la transcription et de la recombinaison, il n'est pas surprenant qu'elle affecte l'orientation de l'EI de l'opéron *fim*. Il a été démontré que H-NS avait un effet négatif sur la fréquence d'inversion de l'EI. La protéine aurait surtout un effet sur la recombinaison déclenchée par FimB plutôt que celle effectuée par FimE (Kawula et Orndorff, 1991; O'Gara J et Dorman, 2000). Contrairement à H-NS, le régulateur global Lrp (« leucine-responsive regulatory protein ») aurait aussi un effet sur l'expression des fimbriae de type 1, mais cet effet serait positif. Ce régulateur n'agirait par contre pas sur les recombinases FimB et FimE mais plutôt directement sur des sites de liaisons situés sur l'EI (Roesch et Blomfield, 1998).

On sait aussi que les inversions de la position ouverte à fermée effectuées grâce à FimE sont plus fréquentes lorsque la température est inférieure à 37 °C. La température a par contre un tout autre effet sur la seconde recombinase. En effet, des températures égales ou légèrement supérieures à 37 °C favorisent grandement l'activité de FimB.

Globalement, la température affecte les deux recombinaisons de façons opposées, mais cela dans un but commun d'obtenir un état de faible expression des fimbriae de type I à températures tièdes et de favoriser la production lorsque la température est plus élevée (Gally *et al.*, 1993).

D'autres paramètres environnementaux tels que le pH et l'osmolarité du milieu de culture ont des effets sur la production des fimbriae de type I. Le pH semble affecter les promoteurs de *fimA*, *fimB* et *fimE* de la même façon. Les trois promoteurs sont exprimés optimalement à pH neutre et sont plus affectés par des pH acides que basiques. Lorsque les trois promoteurs sont réprimés de la même façon, l'EI a une tendance vers la position fermée mais des inversions vers la position ouverte ont encore lieu, le pH à lui seul n'a donc qu'une petite influence sur l'expression des fimbriae. Pour ce qui est de l'osmolarité, on remarque une tendance marquée de l'EI pour la position fermée à haute pression osmotique. Ce phénotype concorde avec une diminution de l'expression des promoteurs de *fimA* et de *fimB*, ainsi que d'une augmentation pour le promoteur de *fimE*. À l'inverse, une faible osmolarité provoque une préférence de l'EI pour la position ouverte. De plus, on a remarqué qu'en conditions acides, les effets d'une forte osmolarité sont amplifiés (Schwan *et al.*, 2002).

La concentration ambiante de phosphate pourrait aussi avoir une influence sur la production des fimbriae de type I. Une étude a récemment démontré, dans un contexte de souche APEC, qu'en l'absence des gènes *pstCAB*, un système de détection de concentration et transport de phosphate, la production des fimbriae de type I est fortement diminuée. La même étude a révélé que l'absence du système *pst* provoquait une chute de transcription du gène *fimB*, mais avait aucun effet sur *fimE* ce qui pourrait expliquer la réduction majeure de transcription de l'opéron *fim* (Crepin *et al.*, 2008).

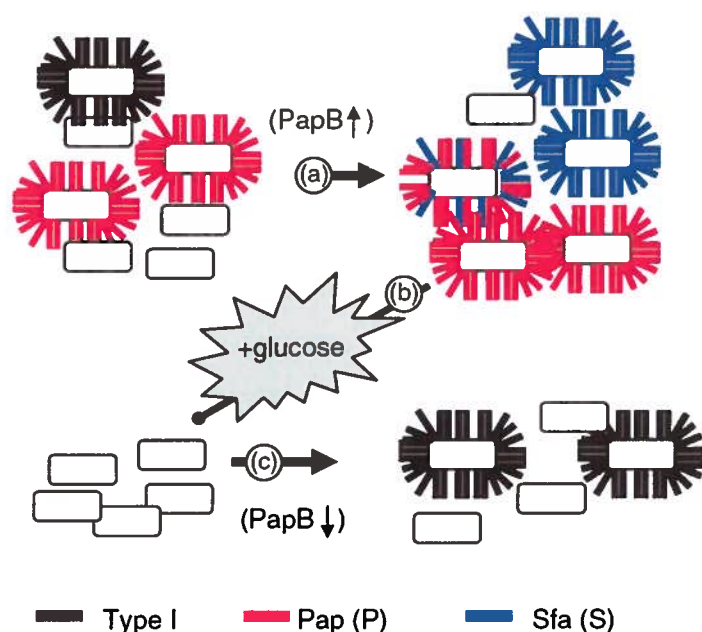
Tout récemment deux nouveaux facteurs produits par l'hôte influençant l'expression de l'opéron *fim* ont été identifiés. Il s'agit de l'acide *N*-acétylneuramidique ainsi que du GlcNAc-6P qui sont de bons indicateurs d'une réponse inflammatoire de l'hôte, mais qui peuvent aussi être utilisés comme source de carbone par les bactéries. Les voies métaboliques permettant de dégrader et d'utiliser ces composés incluent des

intermédiaires qui permettent d'inhiber la synthèse des fimbriae de type 1 (Chu et Blomfield, 2006; Chu, 2009).

Plus particulièrement dans le contexte de la méningite néonatale, il est connu que certains gènes influencent la production des fimbriae de type 1. IbeA et OmpA sont des protéines fréquemment exprimées par les souches MNEC. On a autrefois cru qu'elles étaient toutes deux impliquées directement dans le phénomène d'adhérence puisque des mutants  $\Delta ibeA$  et  $\Delta ompA$  ont une capacité d'adhérence limitée. Par contre, il a récemment été découvert que ces protéines influençaient l'adhérence en modifiant l'expression des fimbriae de type 1. En effet, il a été démontré que la délétion des gènes *ibeA* et *ompA* favorise grandement la position fermée de l'élément inversible sur lequel siège le promoteur de l'opéron *fim*, ce qui a pour effet de réduire considérablement l'expression des fimbriae de type 1. La protéine OmpA aurait par contre tout de même un rôle à jouer directement dans le phénomène d'adhérence aux cellules de la barrière hématoencéphalique (Cortes *et al.*, 2008; Teng *et al.*, 2006).

Plusieurs études affirment aussi que la régulation des fimbriae de type 1 serait affectée par la production de flagelles. Étant donné que ces deux structures ont des fonctions plutôt contradictoires (l'adhérence et la motilité), il a déjà été observé chez différents organismes, une régulation réciproque, utilisant différents mécanismes, permettant d'éviter que des fimbriae et les flagelles soient exprimés au même moment. Une étude par Lane et ses collègues démontre qu'une expression constitutive des fimbriae de type 1 avait pour effet de diminuer considérablement la motilité de la bactérie ainsi que le niveau de flagelline produit. La même étude affirme par contre que ni une sur-expression ni une sous-expression des flagelles n'affectaient la production des fimbriae de type 1 dans leur modèle impliquant une souche UPEC (Lane *et al.*, 2005). Une autre étude par un groupe différent affirme par contre qu'un important régulateur de flagelles, le facteur  $\sigma$  FliA, aurait une influence sur l'expression de l'opéron *fim*. Selon leurs recherches, cette régulation passe par une cascade très complexe dépendant entre autres d'un second messager, le di-GMP-cyclique (Claret *et al.*, 2007). Ce phénomène sera sans doute très étudié et approfondi dans les années à venir.

Enfin, un autre facteur affectant la production des fimbriae de type 1 est connu. Il s'agit tout simplement de la production d'autres fimbriae. Ce phénomène appelé « cross-talk » est le résultat de variations de phase coordonnées de plusieurs fimbriae. Des éléments régulateurs de plusieurs opérons fimbriaires sont en effet capables d'affecter l'expression d'autres fimbriae. Ces réseaux de régulations étant très complexes et pas encore entièrement élucidés vu le nombre important de fimbriae et de régulateurs chez les ExPEC, ce phénomène ne sera pas abordé en détails dans cet ouvrage. On peut par contre observer, à la **Figure 1.6**, un exemple simplifié d'un réseau probable de « cross-talk » chez *E. coli* (Holden et Gally, 2004; van der Woude, 2006).



**Figure 1.6** Le phénomène du « cross-talk » entre les fimbriae.

a. L'expression des fimbriae P augmente la concentration de la protéine régulatrice PapB ce qui favorise la production des fimbriae P et S. b. L'exposition au glucose réprime l'expression des fimbriae P ainsi que de son régulateur PapB. c. Une faible concentration de PapB a pour effet de favoriser une orientation ouverte de l'EI de l'opéron *fim* et ainsi d'entraîner la production des fimbriae de type 1 (van der Woude, 2006).

#### 1.6.5.1.1.3 Importance dans la virulence

Dans la vessie humaine, les récepteurs spécifiques aux fimbriae de type 1 sont les uroplakines Ia qui recouvrent la surface apicale des cellules urothéliales superficielles de type « umbrella » (Mulvey *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2001). À ce jour, les récepteurs



spécifiques aux fimbriae de type 1 dans le contexte aviaire et le contexte de méningite néonatale n'ont toujours pas été identifiés avec certitude. On sait par contre que ces fimbriae ont la capacité de se lier à des glycoprotéines mannosylées telle que l'urolakine la ainsi qu'aux collagènes de type I et de type IV, à la laminine, à la fibronectine et à la protéine Tamm-Horsfall, une protéine présente en abondance dans l'urine. Les fimbriae de type 1 se retrouvent donc avec une large gamme de types cellulaires et tissulaires auxquels adhérer. Il peut notamment adhérer aux cellules épithéliales de la vessie et du rein, aux cellules buccales, aux érythrocytes, à certaines cellules immunitaires ainsi qu'à la matrice extracellulaire (Mulvey, 2002).

Dans le cadre des infections du tractus urinaire causées par les UPEC, les fimbriae de type 1 constitue un facteur de virulence majeur. Ils sont grandement responsables de l'attachement initial des bactéries aux cellules de la vessie. Le groupe de Connell a d'ailleurs prouvé que le fimbria de type 1 satisfait les postulats moléculaires de Koch en tant que facteur de virulence dans un modèle d'ITU murin (Connell *et al.*, 1996; Johnson, 1991; Wiles *et al.*, 2008). De plus, les fimbriae de type 1 sont grandement impliqués dans le phénomène des communautés bactériennes intracellulaires qui permettent aux bactéries d'accentuer leur pouvoir pathogène et leur capacité à provoquer des récurrences (Justice *et al.*, 2004).

Chez les souches NMEC, le rôle des fimbriae de type 1 est bien défini. Cette adhésine est utilisée par les bactéries, en combinaison avec d'autres facteurs, pour adhérer aux cellules HBMEC qui forment la barrière hématoencéphalique. C'est ce contact qui permettra aux bactéries d'ensuite envahir et de traverser ces cellules. Sans ce passage au travers de la BHE, la méningite ne peut tout simplement pas avoir lieu (Kim, 2003; Teng *et al.*, 2005).

Tous comme pour l'ensemble des souches de *E. coli*, la majorité des APEC possèdent les fimbriae de type 1 (La Ragione *et al.*, 2000; La Ragione et Woodward, 2002). C'est surtout dans la trachée, dans les poumons et dans les sacs aériens que l'on retrouve une forte expression des fimbriae de type 1 (Dozois *et al.*, 1994; Pourbakhsh *et al.*, 1997b). On sait que les fimbriae de type 1 permet l'adhérence *in vitro* à des cellules épithéliales. De plus, dans un modèle d'infection de poulets, ces fimbriae ont été

démontrés comme étant grandement impliqué, mais pas essentiel à la colonisation, l'invasion et la persistance. Malgré le fait que son rôle précis dans l'infection n'a toujours pas été élucidé, on considère que les fimbriae de type 1 sont bel et bien un facteur de virulence chez les APEC puisqu'en son absence, le potentiel pathogène est considérablement diminué (La Ragione *et al.*, 2000; Marc *et al.*, 1998).

#### 1.6.5.1.2 Les fimbriae P

Les fimbriae P, ont été nommés ainsi d'après leur association avec la pyélonéphrite ainsi que pour leur affinité pour l'antigène sanguin P. Tout comme les fimbriae de type 1, ils possèdent une structure hélicoïdale similaire et pratiquent la variation de phase (Hull *et al.*, 1981; Korhonen *et al.*, 1982; van der Woude et Baumler, 2004). Chaque fimbria P est essentiellement constitué d'un filament d'environ un millier de sous-unités majeures PapA. Ce filament est ancré à la cellule à sa base grâce à la protéine PapH. À son extrémité distale on retrouve quelques copies de différentes sous-unités mineures telles que PapE et PapF ainsi que l'importante sous-unité PapG qui sert d'adhésine (Baga *et al.*, 1987; Lindberg *et al.*, 1989; Lindberg *et al.*, 1984; Lund *et al.*, 1987). Il existe trois différentes classes d'adhésines PapG (PapGI, PapGII et PapGIII) qui permettent toutes une adhésion à des récepteurs contenant des motifs Gal $\alpha$ 1-4Gal légèrement différents. Ces récepteurs sont surtout retrouvés à la surface des cellules rénales ainsi que sur les érythrocytes de l'hôte (Leffler et Svanborg-Edén, 1980; Stromberg *et al.*, 1990).

Les gènes servant à produire les fimbriae P forment l'opéron *pap* et sont retrouvés surtout chez les souches UPEC, particulièrement celles qui causent des pyélonéphrites, mais également chez certaines souches MNEC et APEC (Brauner *et al.*, 1985; Dozois *et al.*, 1992; Hacker, 1990; Johnson *et al.*, 2002). En effet, plus du deux tiers des souches causant des pyélonéphrites expriment les fimbriae P tandis que moins du quart des souches causant exclusivement des cystites les exprime. Cela suggère que les fimbriae P jouent un rôle important dans la colonisation du tractus urinaire supérieur. De plus, la prévalence des fimbriae P chez les souches retrouvées dans le sang de patients ayant développé une septicémie suite à une infection urinaire est similaire à celle des souches de pyélonéphrite. Ces données confirment donc que la présence de fimbriae P est

associée aux formes les plus sévères d'ITU (Arthur *et al.*, 1990; Brauner *et al.*, 1985; Johnson, 1991). De plus, différentes études, dont une impliquant l'inoculation de volontaire humains, démontrent qu'en plus d'être fortement impliqué dans la colonisation des reins, ces fimbriae déclenchent aussi une forte réponse immunitaire dans le tractus urinaire, ce qui est un facteur important dans l'aggravation des symptômes (de Man *et al.*, 1988; Wullt *et al.*, 2001).

Chez les APEC, selon les différentes études, de 41 à 78 % des souches expriment des fimbriae P et ces souches sont fortement associées à la septicémie chez le poulet et à la mortalité chez la dinde (Dozois *et al.*, 1992; van den Bosch *et al.*, 1993). Puisque les récepteurs des fimbriae P sont absents des voies respiratoires supérieures des poulets, on croit que dans le cas des infections aviaires, ces fimbriae sont impliqués dans les phases tardives de l'infections plutôt que dans l'adhérence initiale (Dozois *et al.*, 1995; Pourbakhsh *et al.*, 1997b).

Le rôle des fimbriae P dans la pathogénèse de la méningite néonatale causée par *E. coli* n'a pas encore été clairement démontré à ce jour. Environ 20 % des souches MNEC possèdent des fimbriae P. Puisqu'il peut arriver que la méningite néonatale se développe suite à une septicémie issue d'une ITU, il est possible que le seul rôle pour les fimbriae P dans la méningite se situe au niveau de la colonisation initiale du tractus urinaire supérieur qui précède le passage vers la circulation sanguine (Bonacorsi *et al.*, 2003; Bonacorsi et Bingen, 2005; Johnson *et al.*, 2002).

#### **1.6.5.1.3 Les fimbriae S**

Tout comme pour la majorité des fimbriae, les fimbriae S sont composés d'une répétition de sous-unités majeures formant un filament avec quelques sous-unités mineures à l'extrémité dont une joue le rôle d'adhésine. Dans ce cas précis, c'est SfaA qui sert de sous-unité majeure et qui est surmontée des sous-unités accessoires SfaG et SfaH et de l'adhésine SfaS (Moch *et al.*, 1987; Morschhauser *et al.*, 1990; Mulvey, 2002). Cette adhésine reconnaît l'acide sialique présent à la surface de certaines cellules et permet donc aux souches qui l'expriment d'adhérer à plusieurs tissus des reins et à différents endothéliums (Korhonen *et al.*, 1986; Parkkinen *et al.*, 1989).

Les fimbriae S sont associés aux souches UPEC mais d'avantage aux souches MNEC (Kim, 2003; Ott *et al.*, 1986). Le groupe de Korhonen l'a retrouvé chez 36 % des souches responsables de la méningite, chez 7 % des isolats de cas de pyélonéphrites et chez seulement 4 % des souches fécales (Korhonen *et al.*, 1985). L'importance des fimbriae S pour la virulence a d'ailleurs été démontrée dans les modèle *in vivo* de pyélonéphrite et de méningite chez le rat (Marre *et al.*, 1986; Saukkonen *et al.*, 1988).

#### **1.6.5.1.4 Les fimbriae F1C**

Les fimbriae F1C sont codés par les gènes *foc* qui sont d'ailleurs fortement homologues aux gènes *sfa* qui codent pour les fimbriae S (Ott *et al.*, 1987). Chaque fimbria S est donc constitué respectivement des sous-unités structurales majeure et mineures FocA, FocF, FocG et FocH (Riegman *et al.*, 1990). Malgré toutes ressemblances, les fimbriae F1C possèdent un récepteur différent de celui des fimbriae S. Sa spécificité pour le disaccharide GalNAc  $\beta$ 1-4Gal  $\beta$  lui permet d'adhérer aux cellules épithéliales des tubes collecteurs et des tubules distaux des reins ainsi qu'aux cellules endothéliales de la vessie et des reins (Khan *et al.*, 2000; Virkola *et al.*, 1988).

Les fimbriae F1C ont seulement, à ce jour, été associés aux infections du tractus urinaire. On le retrouve à la surface d'environ 14 % des souches UPEC et chez seulement 7 % des isolats fécaux. Cette prévalence, en plus de l'affinité pour les tissus du système urinaire portent à croire que ces fimbriae ont un rôle à jouer dans la virulence des UPEC qui l'arborent. De plus, le groupe de Siitonen a fait ressortir le rôle des fimbriae F1C dans la virulence en étudiant une banque de 383 isolats urinaires cliniques (Mulvey, 2002; Siitonen *et al.*, 1993).

#### **1.6.5.1.5 Les curli**

Les curli ont été découvert en 1989 par Olsen et ses collaborateurs. D'abord observés à la surface d'un isolat récupéré d'une mastite bovine, les curli sont alors décrit comme étant de minces fimbriae ondulés (Olsen *et al.*, 1989). On sait aujourd'hui que beaucoup d'entérobactéries, incluant une grande proportion des souches de *E. coli*, en produisent (Zogaj *et al.*, 2003). Chez les pathotypes discutés dans cet ouvrage, c'est seulement chez les APEC qu'on lui a attribué un rôle dans la virulence (Dho-Moulin et Fairbrother, 1999).

Les curli sont les seuls fimbriae abordés dans cet ouvrage qui ne sont pas assemblés par la voie d'assemblage « chaperone-usheer ». Brièvement, les sous-unités sont sécrétées et assemblées de façon extracellulaire à partir d'une protéine de nucléation ancrée à la surface de la cellule (Hammar *et al.*, 1996). L'expression des curli a lieu grâce à deux opérons disposés dans des orientations divergentes. Le premier opéron est composé des gènes *csgABC* qui codent pour la sous-unité structurelle majeure CsgA aussi appelée curline, ainsi que pour CsgB, la protéine de nucléation essentielle à l'assemblage particulier des curli. À ce jour, le rôle du gène *csgC* dans la biosynthèse des curli est toujours inconnu. Le second opéron composé des gènes *csgDEFG*, code plutôt pour des protéines accessoires ayant surtout un rôle à jouer dans la régulation de l'expression des fimbriae (Hammar *et al.*, 1995). À ce sujet, de multiples facteurs tels que la température, l'osmolarité, le pH ainsi que d'autres stress sont connus pour influencer l'expression des curli, compliquant ainsi la régulation de ce dernier. *In vitro*, on observe une expression optimale des curli lorsque les bactéries sont en phase stationnaire, dans un milieu de faible osmolarité, à 26 °C (Olsen *et al.*, 1989; Olsen *et al.*, 1993).

Les curli ont une bonne variété de récepteurs, mais parmi les plus importants on retrouve la fibronectine, les laminines et le plasminogène. Cette panoplie de récepteurs permet donc l'adhérence à différents organes et tissus (La Ragione *et al.*, 2000; Olsen *et al.*, 1989). En plus de jouer un rôle important dans l'adhérence, il a été démontré que les curli peuvent, lorsqu'exprimés en quantité suffisante, induire l'invasion de cellules (Gophna *et al.*, 2001). Dans le cadre de la colibacillose aviaire, les curli auraient un rôle à jouer au niveau de la colonisation, l'invasion et la persistance dans les organes infectés, rehaussant alors le pouvoir pathogène des souches qui les expriment (La Ragione *et al.*, 1999; La Ragione et Woodward, 2002).

Puisqu'ils permettent les interactions entre cellules ainsi que l'adhérence à des surfaces inertes telles que le Teflon et l'acier inoxydable, les curli sont aussi fortement impliqués dans la formation de biofilms dans divers contextes. On retrouve d'ailleurs d'importantes quantités de curli dans la matrice extracellulaire de ces biofilms. Ces propriétés leur permettent donc d'offrir aux bactéries une protection efficace contre la

dessiccation et certains agents antimicrobiens (Austin *et al.*, 1998; Barnhart et Chapman, 2006; Kikuchi *et al.*, 2005).

#### **1.6.5.1.6 Les fimbriae Stg**

Ce n'est qu'en 2006 que les fimbriae Stg ont été caractérisés chez *E. coli*. La région contenant l'opéron aujourd'hui appelé *stgABCD* avait été identifiée, quelques années auparavant, comme un locus pathospécifique chez une souche APEC. Dans le modèle d'infection systémique chez le poulet, ces gènes étaient particulièrement exprimés dans le péricarde des animaux. Des analyses *in silico* ont révélé que l'opéron *stg* est surtout associé aux groupes phylogénétiques B1 et D, ainsi qu'au sérotype O78. On le retrouve donc chez plusieurs souches APEC et MNEC ainsi que chez quelques souches pathogènes intestinales. L'opéron est par contre absent du groupe B2 et par le fait même, n'a pas été identifié chez les souches UPEC testées. (Dozois *et al.*, 2003; Ideses *et al.*, 2005; LyMBERopoulos *et al.*, 2006).

Certaines données portent à croire que plusieurs facteurs auraient un rôle à jouer dans la régulation de l'opéron *stg*. En effet, une répression du promoteur de *stgA* a été observée en présence de concentrations croissantes de fer. La variation des sources de carbone disponibles a aussi des effets sur l'expression des fimbriae. Les mécanismes de régulation ainsi que les autres facteurs l'influençant restent encore à découvrir (LyMBERopoulos *et al.*, 2006).

Aucun récepteur spécifique des fimbriae Stg n'a été identifié à ce jour, il a par contre été démontré que ces fimbriae permettent l'adhérence à de nombreux types de cellules et de tissus aviaires et humains *in vitro*. Toutes ces données mises ensemble portent à croire que les fimbriae Stg ont un important rôle à jouer dans les étapes initiales de la colonisation des sacs aériens par les APEC, ainsi qu'un possible rôle dans la pathogénèse des MNEC (LyMBERopoulos *et al.*, 2006).

#### **1.6.5.1.7 Les fimbriae AC/I**

Les fimbriae AC/I ont été identifiés en 1990 chez une souche APEC. Leur important rôle dans l'adhérence *in vitro* comme *in vivo* a du même coup été démontrée.

On a aussi observé que l'adhérence était beaucoup plus efficace sur les tissus d'origine aviaire qu'humaine (Yerushalmi *et al.*, 1990).

Quoi que possédant un récepteur différent, les fimbriae AC/I possèdent une forte homologie avec les fimbriae S. D'ailleurs, les sous-unités majeures des deux fimbriae ont 24 acides aminés en commun sur un total de 26. On croit donc que les différences de spécificité de tissus et d'hôtes seraient dues à des divergences plus prononcées au niveau des sous-unités mineures, notamment au niveau des adhésines (Babai *et al.*, 1997).

### **1.6.5.2 Les adhésines afimbriaires**

#### **1.6.5.2.1 L'adhésine Iha**

L'adhésine Iha a été identifiée en 2000 par le groupe de Tarr chez la souche entérohémorragique O157:H7. Sa forte homologie avec le sidérophore IrgA, retrouvé chez *Vibrio cholerae*, lui a valu le nom Iha (*IrgA homologue adhesin*). Lorsque Iha a été exprimé chez une souche K-12 initialement non-adhérente, on a observé un phénotype d'adhérence à des cellules HeLa en culture (Tarr *et al.*, 2000).

On retrouve l'adhésine Iha chez environ de 37 à 55 % des souches UPEC et chez près de 30 % des isolats fécaux (Bauer *et al.*, 2002; Johnson *et al.*, 2000). L'importance d'Iha dans la virulence a été démontrée à plusieurs reprises chez différentes souches UPEC grâce au modèle d'infection du tractus urinaire murin (Johnson *et al.*, 2005; Leveille *et al.*, 2006). En plus de ses propriétés adhésives, il a été démontré qu'Iha pouvait aussi servir de récepteur de sidérophores, ce qui aiderait à expliquer son intime homologie avec un sidérophore de *V. cholerae* (Leveille *et al.*, 2006).

#### **1.6.5.2.2 Tsh**

C'est en 1994 que Provence et Curtiss ont identifié, chez une souche APEC, une hémagglutinine qu'ils ont nommée Tsh (*temperature sensitive hemagglutinin*) car elle est préférentiellement exprimée à environ 26 °C. Tsh est une protéine de type autotransporteur tout comme les toxines Sat et Vat discutées à la section 1.6.1.3 (Provence et Curtiss, 1994; Stathopoulos *et al.*, 1999).

Le gène *tsh* est retrouvé chez tout près de la moitié des souches APEC isolées d'animaux malades, alors que très peu d'isolats de *E. coli* provenant d'animaux sains le

possèdent. De plus, il a été démontré qu'environ 91 % des souches de *E. coli* d'origine aviaires arborant l'hémagglutinine Tsh sont pathogènes (Dozois *et al.*, 2000; Maurer *et al.*, 1998).

Selon des expériences *in vitro*, il est connu que Tsh permet aux bactéries d'adhérer aux érythrocytes, à l'hémoglobine et à des protéines de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine et le collagène de type IV (Kostakioti et Stathopoulos, 2004; Provence et Curtiss, 1994). Des expériences *in vivo* dans un modèle d'aérosacculite chez le poulet ont permis de démontrer que Tsh contribue au développement des lésions dans plusieurs organes. De plus, l'absence de Tsh a ralenti l'établissement de l'infection dans les sacs aériens, suggérant alors qu'il contribue aux étapes de colonisation, fort probablement au niveau de l'adhérence aux tissus du système respiratoire (Dozois *et al.*, 2000).

### **1.6.5.3 La famille d'adhésines Dr**

On compte à ce jour, dans la famille plutôt hétéroclite des adhésines Dr, 15 membres dont certains sont des fimbriae et d'autres des adhésines afimbriaires. Toutes ces adhésines reconnaissent et peuvent se lier à différentes régions de l'antigène érythrocytaire Dr. Le point commun qui les rassemble dans cette famille d'adhésines est donc la capacité à agglutiner les érythrocytes qui en sont porteurs. Les adhésines de la famille Dr les plus étudiées et les plus répandues chez les UPEC sont sans doute les fimbriae Dr et les adhésines afimbriaires Afa et Nfa (Nowicki *et al.*, 1990; Servin, 2005).

En plus de l'antigène Dr, les adhésines de la famille Dr ont comme récepteur commun la protéine membranaire DAF (facteur accélérateur de la dissociation) (Nowicki *et al.*, 1993). Dans le tractus urinaire, cette protéine est exprimée à la surface de différents épithéliums tels que ceux des tubules rénaux, de la vessie et de l'uretère (Medof *et al.*, 1987). De plus, plusieurs adhésines de la famille Dr reconnaissent des récepteurs supplémentaires tels que le collagène de type IV et quelques types de récepteurs de la famille CEACAM (molécule d'adhésion cellulaire reliée à l'antigène carcino-embryonnaire). Ces différents récepteurs se retrouvent sur une variété de tissus épithéliaux et endothéliaux ainsi qu'à la surface de cellules hématopoïétiques (Berger *et al.*, 2004; Westerlund *et al.*, 1989).



Dans un contexte d'infections urinaires, grâce aux multiples récepteurs qui s'offrent à elles, ces adhésines permettent aux bactéries d'adhérer à une multitude de tissus rénaux et vésicaux, ce qui est une étape importante dans le développement d'une ITU. En plus de permettre l'adhérence, certaines adhésines de la famille Dr permettent aussi l'invasion, ce qui augmente le pouvoir pathogène des souches qui les expriment (Goluszko *et al.*, 1997). Les adhésines de la famille Dr sont donc intimement reliées à la virulence des souches UPEC où on les retrouve dans près de 50 % des cas. Plus particulièrement, ces adhésines sont associées aux ITU récurrentes puisqu'elles font doubler le risque de récurrence suite à une première infection (Foxman *et al.*, 1995).

## **1.7 Traitement des infections du tractus urinaire**

Étant donné que plus de 9 millions de gens sont touchés par des infections causées par des souches ExPEC chaque année aux États-Unis, il est impératif de discuter des stratégies actuellement utilisées pour faire face à cette menace ainsi que de celles qui auraient le potentiel d'un jour être mises en pratique (Russo et Johnson, 2003).

### **1.7.1 Les antibiotiques**

À ce jour, les seules possibilités pour le traitement des ITU offertes par les médecins aux patients sont de type antibiotique. Jusqu'à tout récemment et ce depuis des dizaines d'années, tout les patients diagnostiqués avec une ITU recevaient le même traitement. Il s'agit d'un traitement court étalé sur trois jours à raison de deux comprimés par jour de respectivement 160 mg et 800 mg de triméthoprim-sulfaméthoxazole (TMP-SMX). Seulement dans les cas d'allergie au SMX, les comprimés prescrits ne contenaient que 200 mg de TMP. Malheureusement, dans les dernières années le taux de résistance des UPEC à ce traitement s'est mis à monter en flèche. Une étude effectuée aux États-Unis entre 1995 et 2001 démontre que le taux de résistance au TMP-SMX a passé de 14,8 % à 17,0 % au cours de cette période. Actuellement, le « Infectious Diseases Society of America » conseil toujours d'administrer ce traitement aux patients situés dans des régions où le taux de résistance est inférieur à 10 à 20 %. Dans le cas où le taux de résistance est trop élevé, les médecins se retournent généralement vers les fluoroquinolones. L'agent antibiotique de cette classe qui est le plus utilisé est la ciprofloxacine. En 1995, seulement 0,7 % des isolats provenant d'ITU étaient résistants à

cet antibiotique. En 2001, ce taux de résistance avait grimpé jusqu'à 2,5 %. Malgré que ce taux de résistance soit toujours considéré comme faible, sa vitesse de croissance est très inquiétante.

Bien sur, d'autres antibiotiques sont considérés comme alternatives potentielles, tel que l'ampicilline, le nitrofurantoïne et la fosfomycine, mais leurs taux de résistance ne sont pas tellement plus encourageants que ceux du TMP-SMX et de la ciprofloxacine. Il est aussi de moins en moins rare de rencontrer des organismes multi-résistants puisque plusieurs gènes de résistance aux antibiotiques se transmettent en bloc dans les populations bactériennes. En plus des problèmes de résistance, l'utilisation d'antibiotiques perturbe aussi la flore normale intestinale et vaginale. Il n'est donc pas rare de voir des patientes développer une vaginite à levures suite à un traitement antibiotiques pour une ITU (Gupta *et al.*, 2001; Gupta, 2003; Karlowsky *et al.*, 2002; Nicolle, 2003; Reid, 1999; Russo et Johnson, 2003).

## **1.7.2 Alternatives aux traitements antibiotiques classiques**

De toutes évidences, les ITU sont de plus en plus difficiles à gérer avec des antibiotiques et différentes alternatives à ces traitements devront être développées et mises sur le marché dans un avenir rapproché. Depuis plusieurs années plusieurs groupes de recherche se sont penchés sur la question et différentes suggestions de stratégies de prévention et de traitement ont été proposées, certaines plus prometteuses que d'autres, en voici donc quelques exemples.

### **1.7.2.1 Changements dans les habitudes de vie**

Le principal facteur comportemental associé aux ITU est tout simplement le fait pour les femmes d'être actives sexuellement. Puisque ce comportement ne peut être complètement évitable, certains traitements antibiotiques prophylactiques post-coïtaux ont été instaurés chez des femmes prises avec des ITU récurrentes. Malgré un bon succès au niveau de la prévention, cette solution est tout de même vulnérable aux problèmes de résistances (Stapleton *et al.*, 1990). Du côté de la contraception, l'utilisation de spermicides et du diaphragme ont été tenus responsables du développement de certaines ITU récurrentes, ces méthodes de contraception sont évidemment à bannir pour les femmes

qui les utilisent et qui développent des ITU fréquemment. (Scholes *et al.*, 2000) Aucun autre activité, produit d'hygiène ou type de vêtement n'ont été directement associés aux ITU à ce jour. Il a par contre déjà été proposé qu'un nettoyage de la région périurétrale deux fois par jour avec une solution de povidone-iodine était une bonne habitude à prendre pour la prévention des ITU, mais l'efficacité de ce nettoyage est insuffisante pour en faire un traitement de choix (Brumfitt *et al.*, 1983; Reid, 1999).

### 1.7.2.2 Les vaccins

Cela fait plusieurs dizaines d'années que la recherche d'un vaccin efficace contre les ITU est amorcée. Le plus grand défi est de trouver un antigène commun et hautement conservé chez les UPEC et si possible chez les autres microorganismes causant des ITU. Des approches utilisant alors des fimbriae, des analogues de récepteurs de ces fimbriae, ainsi que des bactéries entières tuées ont été essayées mais aucune de ces tentatives ne se sont rendues à des étapes d'essais cliniques (Aronson *et al.*, 1979; Eden *et al.*, 1982; Poggio *et al.*, 2006; Ruttgers et Grischke, 1987; Uehling *et al.*, 1990).

Puisque le fimbria de type 1 est un bon candidat, il a fait l'objet de la majorité des projets de développement de vaccins au fil des ans. Dans les dernières années, le groupe de Langermann a été très actif dans le domaine. Ils ont développé un vaccin contre la sous-unité adhésive FimH des fimbriae de type 1, mais ont ensuite réalisé qu'un vaccin dirigé contre la combinaison FimC et FimH était plus efficace. Des résultats encourageants ont été observés dans un modèle murin et par la suite dans un modèle de primate non-humain représenté par le macaque. De plus, ils ont démontré dans ce modèle simiesque que des anticorps produits grâce au vaccin se retrouvaient jusque dans les sécrétions vaginales, protégeant alors d'une colonisation dans ce réservoir. Aussi, des analyses sur la flore intestinale ont démontré que les taux de *E. coli* et des autres coliformes n'étaient pas affectés par le vaccin. Malgré tout ces résultats prometteurs, encore beaucoup d'ajustements au niveau des adjuvants et des doses restent à être mis au points avant que des essais sur les humains aient lieu (Langermann *et al.*, 1997; Langermann *et al.*, 2000; Langermann et Ballou, 2001).

### 1.7.2.3 L'utilisation de probiotiques

Les probiotiques sont, par définition, des microorganismes vivants qui ont un effet bénéfique sur la santé de leur hôte lorsqu'ils sont en assez grande quantité. Il est connu que les bactéries de la flore normale commensale intestinale et urogénitale contribuent à différentes fonctions des organes qu'elles colonisent. L'usage de probiotiques sert donc à renforcer ou même à restaurer une flore normale faible ou perturbée. Les femmes en santé qui produisent de l'œstrogène ou en prennent en comprimés ont une flore normale vaginale d'environ  $10^7$  à  $10^8$  UFC par gramme de fluides dominée par des bactéries du genre *Lactobacillus*. Plus de 80 espèces de *Lactobacillus* peuvent se retrouver dans cette flore et elles jouent un rôle dans le contrôle de l'environnement vaginal notamment en produisant des acides lactiques permettant de maintenir un pH inférieur à 4,5. Ces conditions acides permettent la croissance des *Lactobacillus* mais inhibent celle de plusieurs autres microorganismes tels que les UPEC et d'autres pathogènes. En plus d'acidifier le milieu, certaines espèces de lactobacilles peuvent lutter contre les UPEC en produisant des bactériocines ou du peroxyde d'hydrogène. Des souches peuvent aussi synthétiser des biosurfactants qui auraient pour effet d'empêcher les uropathogènes à adhérer aux cellules épithéliales de la vessie ou du vagin, accélérant du même coup leur élimination (Aroutcheva *et al.*, 2001; Barrons et Tassone, 2008; Forsum *et al.*, 2005; Sweet, 2000; Velraeds *et al.*, 1996).

Dans les dernières années quelques études portant sur de traitements probiotiques prophylactiques contre les récurrences d'ITU ont été menées sur des sujets humains. Les traitements sont basées sur des formulations de *L. rhamnosus* et/ou *L. fermentum* à raison de  $7,5 \times 10^8$  à  $4 \times 10^{10}$  UFC par dose en administration orale ou vaginale. Certains des traitements probiotiques ont été combinés à des traitements antibiotiques ou à la consommation quotidienne de jus de canneberge et d'airelles. À ce jour, aucune des formulations n'a obtenu des résultats suffisants pour être considéré comme un traitement efficace à lui seul, mais certains projets sont très prometteurs. On peut par contre observer que les formulations de suppositoires vaginaux semblent plus efficaces que les comprimés oraux, que la consommation fréquente de jus de canneberge et d'airelles semble diminuer le taux de récurrence des ITU et que les deux souches testées ont donné

des résultats similaires (Barrons et Tassone, 2008; Kontiokari *et al.*, 2001; Reid, 1999; Reid *et al.*, 2001; Reid et Bruce, 2001).

#### **1.7.2.4 Les thérapies anti-adhérence**

Un très grand nombre de pathogènes entériques, oraux, respiratoires et urinaires ont besoin de l'adhérence pour établir une colonisation efficace nécessaire au développement d'une infection. L'imposante section 1.6.5 démontre très bien à quel point l'adhérence est d'une importance capitale dans la pathogénèse de plusieurs groupes d'ExPEC. La thérapie anti-adhérence consiste tout simplement à empêcher l'adhérence d'avoir lieu ou bien à dissocier un agent pathogène du tissu auquel il adhère par différents moyens. Contrairement aux traitements antibiotiques, les différentes thérapies ciblant l'adhérence ont peu de chances d'être contrées par des résistances de la part des pathogènes bactériens puisqu'elles n'agissent pas en tuant ni en arrêtant la prolifération des bactéries. (Ofek *et al.*, 2003).

Parmi les traitements alternatifs aux antibiotiques décrits dans les sections précédentes certains ont un effet sur l'adhérence. Les vaccins ciblant des adhésines peuvent entraîner le blocage de ces adhésines par des anticorps en plus de déclencher plusieurs autres phénomènes immunologiques. De plus, certaines souches probiotiques sécrètent des biosurfactants qui rendent beaucoup plus difficile l'adhérence à certaines surfaces. Les types de thérapie décrits dans les sections qui suivent sont ceux qui agissent uniquement sur l'adhérence (Barrons et Tassone, 2008; Langermann et Ballou, 2001; Ofek *et al.*, 2003).

##### **1.7.2.4.1 Les inhibiteurs de biosynthèse de récepteurs**

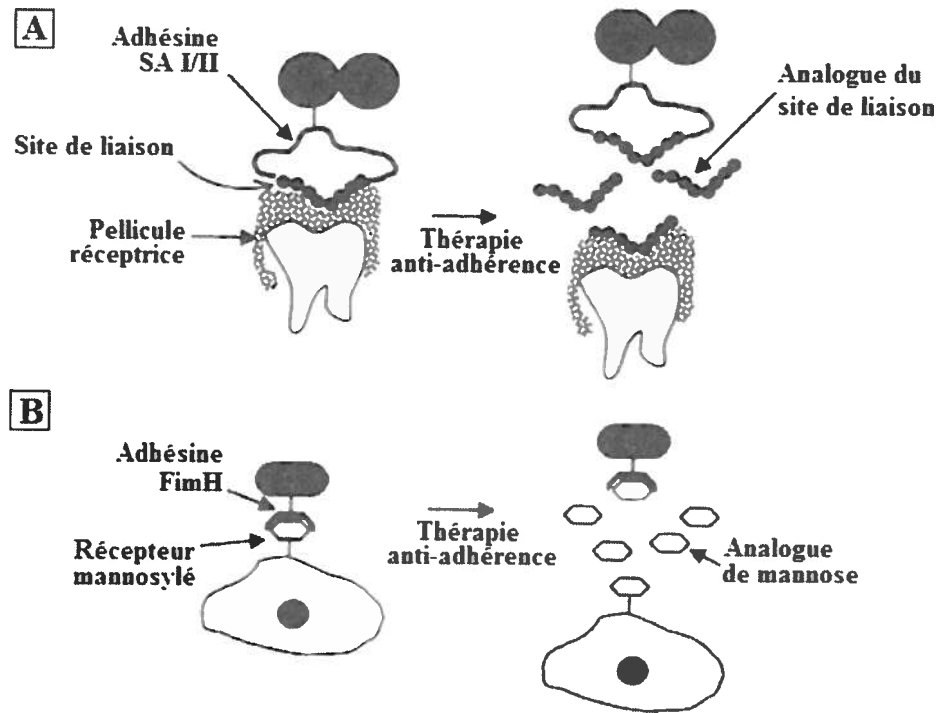
Puisqu'un lien d'adhérence a besoin d'au minimum deux éléments, une adhésine bactérienne et un récepteur hôte, l'absence d'un de ces éléments pourrait très bien permettre d'éviter l'établissement d'un lien. Il existe des agents pharmacologiques qui ont la capacité d'intervenir dans la synthèse de certains récepteurs présents à la surface de cellules épithéliales. Le *N*-butyldeoxynojirimycine (NB-DNJ) en est d'ailleurs un bon exemple puisqu'il est capable d'inhiber l'une des premières étapes de la biosynthèse des glycosphingolipides qui sont les récepteurs des fimbriae P. Le groupe de Platt a testé les effets à long terme du NB-DNJ dans un modèle murin. Le composé a été intégré à la

nourriture de jeunes souris durant une période d'environ trois mois. Malgré un léger ralentissement de leur croissance, les animaux ont très bien toléré le NB-DNJ. Une réduction des glycosphingolipides de 50 à 70 % a été observée sur différents tissus. Des tests d'adhérence bactérienne *in vitro* sur des cellules en culture, ont révélé qu'en présence de bonnes quantités de NB-DNJ, l'adhérence est presque complètement inhibée. De plus, des études *in vivo* dans un modèle d'infection du tractus urinaire murin en présence et en absence de NB-DNJ ont démontré que le composé a permis de réduire significativement la colonisation des reins. Puisque le NB-DNJ est excrété de façon intacte par les reins, une administration orale du composé entraîne de fortes concentrations du composé dans tout le tractus urinaire. Le NB-DNJ est donc un excellent candidat dans le traitement ou la prévention des ITU causées par des souches qui utilisent principalement les fimbriae P (Platt *et al.*, 1994; Platt *et al.*, 1997; Svensson *et al.*, 2001).

#### 1.7.2.4.2 Les analogues d'adhésines

L'un des moyens utilisés afin d'éviter ou de briser un lien d'adhérence est d'utiliser des analogues de l'adhésine impliquée dans le lien ciblé. Ce type de thérapie est basé sur l'idée que l'analogue utilisé fera compétition à la véritable adhésine au niveau des récepteurs de l'hôte. À ce jour, les analogues d'adhésines ont été peu utilisés dans la thérapie anti-adhérence mais plusieurs groupes travaillent à les utiliser dans le développement de nouvelles thérapies. Jusqu'à présent, aucun traitement utilisant des analogues d'adhésines n'a été étudié dans le cas des infections par les ExPEC, mais voici tout de même un aperçu des quelques approches qui ont été étudiées chez d'autres types de pathogènes.

Le groupe de Kelly a développé une application intéressante impliquant les analogues d'adhésines concernant la carie dentaire que l'on peut voir schématisée en A à la **Figure 1.7**. Chez les humains, la carie dentaire est principalement causée par la bactérie *Streptococcus mutans*. Son adhésine afimbriaire protéinique nommée SA I/II pour « streptococcal antigen I/II » a la capacité de lier une mucine salivaire abondante dans la salive humaine. Le groupe de Kelly a synthétisé un petit peptide de 20 acides aminés correspondant à un épitope d'adhésion de SA I/II. Ils ont ensuite démontré



**Figure 1.7** Les deux types de thérapie anti-adhérence utilisant des analogues.

**A. Analogue d'adhésine :** Ce type de thérapie consiste à utiliser des analogues d'adhésines pour compétitionner contre les réelles adhésines pour les récepteurs de l'hôte. Dans l'exemple schématisé, cette thérapie est utilisée pour empêcher *Streptococcus mutans* d'adhérer aux protéines de la salive qui forment une pellicule sur les dents. **B. Analogue de récepteur :** Ce type de thérapie consiste quant à lui à utiliser des analogues de récepteurs pour occuper les sites de liaison des adhésines et ainsi empêcher le contact avec les récepteurs de l'hôte. Dans le cas schématisé ici, un analogue de mannose est utilisé pour empêcher *Escherichia coli* d'adhérer à des cellules épithéliales tel que dans le cas d'une ITU (adapté de Ofek *et al.*, 2003)

qu'une application topique de leur peptide sur les dents préalablement traitées à la chlorexidine avait pour effet de retarder significativement la recolonisation de la bouche par *S. mutans*. Ce traitement demande encore de la mise au point puisqu'il est bien connu qu'en présence de sucrose, la bactérie utilise d'autres adhésines en plus de SA I/II pour arriver à ses fins. L'étude démontre toutes fois qu'il est réaliste d'imaginer que des traitements efficaces impliquant des analogues de récepteurs protéiniques pourraient un jour se retrouver sur le marché (Kelly *et al.*, 1999; Ofek *et al.*, 2003).

Le concept de traitement par des analogues d'adhésines a aussi été testé dans un contexte d'adhésines non protéiniques. Les streptocoques des groupes A et B peuvent effectuer une adhérence grâce à des résidus d'acide lipoteichoïque à leur surface. Une application topique d'acide lipoteichoïque sur différents parties du corps a été étudiée par

plusieurs équipes. Le traitement a démontré d'excellents résultats au niveau de l'élimination des streptocoques visés de la flore des modèles canins et murins utilisés. Malheureusement, l'acide lipoteichoïque a démontré une forte toxicité, allant jusqu'à tuer plusieurs animaux ayant reçu un traitement. Ce composé ne pourra jamais servir de traitement chez les humains mais pourra toutes fois servir de modèle dans le développement d'autres stratégies thérapeutiques utilisant des analogues d'adhésines (Cox, 1982; Dale *et al.*, 1994; Ofek *et al.*, 2003).

#### 1.7.2.4.3 Les analogues de récepteurs

À l'inverse des analogues d'adhésines, les analogues de récepteurs ont la capacité de lier les adhésines portées par les bactéries et font ainsi compétition aux récepteurs de l'hôte. Ce type de thérapie anti-adhérence, schématisé en B à la **Figure 1.7**, est surtout utilisé dans le cas de récepteurs contenant des régions glucidiques puisque l'utilisation de saccharides en tant qu'agents thérapeutiques est plutôt facile et rarement toxique. Puisque les fimbriae de type 1 font partie des adhésines spécifiques à des récepteurs glucidiques et qu'ils jouent un rôle clé dans la pathogénèse de beaucoup d'ExPEC, il est une cible de choix pour ce type de thérapie (Ofek *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont eu du succès avec des analogues des récepteurs des fimbriae de type 1 et P dans un contexte d'ITU par des UPEC. Dans le cas des fimbriae de type 1, les principaux analogues utilisés sont le mannose, le méthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside ainsi que plusieurs de leurs dérivés. Le méthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside réussit d'ailleurs à diminuer du deux tiers la colonisation du tractus urinaire de souris grâce à une co-administration transurétrale du composé et de l'inoculum (Aronson *et al.*, 1979; Sharon, 2006). Les analogues de récepteurs ont aussi été efficaces avec plusieurs autres infections telles que les ITU causées par *Klebsiella pneumoniae*, les ulcères d'estomacs causés par *Helicobacter pylori* et les pneumonies causées par *Streptococcus pneumoniae* (Fader et Davis, 1980; Idanpaan-Heikkila *et al.*, 1997; Mysore *et al.*, 1999).

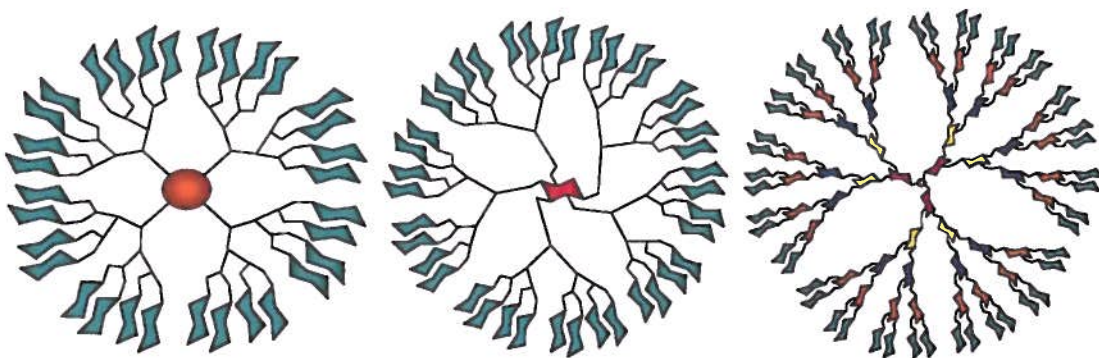
Généralement, pour que ce type de thérapie fonctionne adéquatement, la concentration d'analogue de récepteur doit être plutôt élevée. Cela s'explique par le fait que l'affinité des adhésines pour les saccharides simples en solution est plus faible que pour les réels récepteurs. Différentes modifications chimiques peuvent permettre



d'accroître cette affinité. Le fait de lier l'analogue à certains groupements hydrophobes permet bien souvent d'augmenter l'affinité de 10 à 600 fois. Il est aussi possible de lier plusieurs copies du saccharide utilisé à un même noyau, ce qui a aussi pour effet d'accroître l'affinité à l'adhésine, d'où la naissance des glycodendrimères (Firon *et al.*, 1987; Lindhorst *et al.*, 1998; Mulvey *et al.*, 2001a; Roy, 1996; Sharon, 2006; Simon *et al.*, 1997).

#### 1.7.2.4.3.1 Les glycodendrimères

Par définition, les dendrimères sont des nanostructures synthétiques qui comportent plusieurs unités de macromolécules identiques parfaitement dispersées selon une architecture tridimensionnelle très régulière et ramifiée. De la synthèse de matériaux jusqu'aux applications médicales, ces structures relativement récentes ont une grande variété d'utilités (Bosman *et al.*, 1999). Dans les années 90, René Roy, aujourd'hui chercheur en chimie à l'université du Québec à Montréal, a créé une nouvelle variété de dendrimères qu'il a nommé les glycodendrimères. Ces nouvelles structures peuvent arborer différents glucides au sommet de leurs embranchements et parfois même à d'autres niveaux de la structures, tel qu'illustré à la **Figure 1.8**. Ces molécules ont été créées afin de servir comme analogues synthétiques de différentes glycoprotéines afin de compenser pour la faible affinité des analogues monomériques existants (Roy, 1996). Comme beaucoup de récepteurs de facteurs d'adhésion et de toxines sont des



**Figure 1.8** Différents types de glycodendrimères.

À gauche : glycodendrimère simple avec des glucides seulement aux extrémités des embranchements et un cœur qui n'est pas à base d'un glucide. Centre : glycodendrimère muni d'un cœur glucidique. À droite : glycodendrimère entièrement constitué de glucides interreliés (Roy, 2003).

glycoprotéines, de tels analogues ont ainsi le potentiel d'interférer avec les interactions entre l'hôte et une multitude d'agents pathogènes viraux ou bactériens ainsi qu'avec certaines de leurs toxines. Des applications ont donc été envisagées dans l'inhibition de l'adhérence des bactéries *Escherichia coli*, *Streptococcus suis* et *Pseudomonas aeruginosa*, des toxines de *Vibrio cholerae* et de *Shigella dysenteriae* ainsi que des virus de l'influenza et de l'Ebola (Autar *et al.*, 2003; Hansen *et al.*, 1997; Kitov *et al.*, 2000; Lasala *et al.*, 2003; Lindhorst *et al.*, 2001).

L'avantage des molécules multivalentes par rapport aux analogues monomériques ne se limite pas au nombre accru d'unités pouvant se lier aux adhésines. Les liaisons multivalentes sont aussi beaucoup plus fortes que les liaisons simples, permettant alors aux glycodendrimères d'offrir une compétition beaucoup plus forte aux récepteurs mannosylés pour les sites de liaison des adhésines. De plus, la conformation tridimensionnelle des glycodendrimères permet de lier des adhésines appartenant à plus d'une bactérie, ce qui peut entraîner l'agglutination de ces bactéries. Dans le cas des ITU, les bactéries agglutinées sont plus susceptibles à l'élimination par le flot d'urine étant donné que de très forts liens seraient requis pour permettre à un gros agglutinat bactérien d'être solidement ancrée à l'épithélium (Kiessling *et al.*, 2006; Mammen *et al.*, 1998; Roy, 1996).

En plus des avantages techniques et de leur grande efficacité par rapport aux molécules monomériques, l'utilisation des glycodendrimères mannosylés comme inhibiteurs d'adhérence ont un sérieux avantage par rapport aux antibiotiques puisqu'ils ne risquent pas de provoquer un phénomène de résistance. En effet, puisque la structure des inhibiteurs d'adhérence ressemble beaucoup à celle du récepteur naturel des fimbriae de type 1, il est plutôt improbable que les bactéries développent un mécanisme de résistance à ce traitement. Un tel mécanisme aurait sans doute pour effet de réduire considérablement la capacité des bactéries à adhérer aux récepteurs des cellules hôtes qui sont leurs cibles naturelles. Le mécanisme n'apportant ainsi aucun avantage, il ne serait pas gardé et propagé par pression sélective (Ofek *et al.*, 2003; Pieters, 2007; Touaibia et Roy, 2007).

L'utilisation de glycodendrimères comme inhibiteurs d'adhérence est très prometteuse car les technologies de synthèse permettent de faire varier facilement plusieurs paramètres tels que la valence, la géométrie et l'arrangement topographique des saccharides. Puisque ces caractéristiques jouent beaucoup sur la sélectivité et l'affinité, il est possible d'obtenir des molécules de grande efficacité. De plus, l'apparition récente de dendrimères commerciaux sur le marché rend la synthèse des glycodendrimères encore plus accessible (Roy, 2003; Touaibia et Roy, 2007).

Certains groupes ont déjà eu du succès on niveau de l'inhibition de l'adhérence par les fimbriae de type 1, notamment grâce à des molécules tri-mannosylées et heptamannosylées (Gouin *et al.*, 2009; Lindhorst *et al.*, 2001). Afin de trouver la molécule idéale pour inhiber au maximum l'adhérence par les fimbriae de type 1 de *E. coli*, l'équipe du docteur Roy a plus récemment mis au point une grande variété de glycodendrimères comportant différents nombres d'unités mannosylées. Ces derniers ont été construits à partir de plusieurs structures de base dont certaines sont des dendrimères commerciaux (Touaibia et Roy, 2008). Un certain nombre de ces molécules sont décrites en plus amples détails dans la section 2.3 de cet ouvrage, ce mémoire ayant pour objet l'étude de l'efficacité de ces molécules en tant qu'inhibiteurs de l'adhérence par les fimbriae de type 1 chez les ExPEC.

**Chapitre 2.**  
**Matériels et méthodes**

## 2.1 Souches bactériennes, lignées cellulaires et plasmides

Les souches ExPEC utilisées dans les tests d'agglutination de levures, d'adhérence aux lignées cellulaires et aux cellules primaires et dans les infections sont les trois souches UPEC CFT073 (O6:H1:K2), ECOR72 (O8:H30) et UCB34 (O77:H(nt)), respectivement des groupes phylogénétiques B2, B1 et D, ainsi que leurs mutants, CFT073 $\Delta$ *fimH*, ECOR72 $\Delta$ *fim* et UCB34 $\Delta$ *fim*. Pour les tests sur des coupes congelées de trachée de poulets, les souches utilisées sont les souches APEC  $\chi$ 7122 (O78:K80:H9) et ses mutants  $\chi$ 7279 ( $\chi$ 7122 $\Delta$ *fim*),  $\chi$ 7273 ( $\chi$ 7122 $\Delta$ *tsh*),  $\chi$ 7186 ( $\chi$ 7122 $\Delta$ *csg*),  $\chi$ 7280 ( $\chi$ 7122 $\Delta$ *fim* $\Delta$ *tsh*),  $\chi$ 7281 ( $\chi$ 7122 $\Delta$ *csg* $\Delta$ *fim*),  $\chi$ 7282 ( $\chi$ 7122 $\Delta$ *csg* $\Delta$ *tsh*) et  $\chi$ 7283 ( $\chi$ 7122 $\Delta$ *csg* $\Delta$ *fim* $\Delta$ *tsh*). Pour la mise au point des tests, ce sont les souches d'*E. coli* K-12 non-pathogènes MG1655, BW25113 et QT1069 (BW25113  $\Delta$ *fimH*) qui ont été utilisées. Les souches CFT073 $\Delta$ *lacZYA*, ECOR72 $\Delta$ *lacZYA* et UCB34 $\Delta$ *lacZYA* ont été utilisées comme souches virulentes compétitrices au cours des co-infections dans le modèle murin. Finalement, les souches  $\chi$ 7213 et QT1069 ont été utilisées lors des manipulations génétiques. La souche  $\chi$ 7213 utilisée lors des échanges alléliques est auxotrophe pour le diaminopimelate (DAP), possède le gène *pir* codant pour la protéine  $\pi$  et possède le plasmide pDM915 décrit quelques paragraphes plus loin. La souche QT1069 (BW25113  $\Delta$ *fimH*) utilisée lors de la mutation par la technique de Datsenko et Wanner est en fait un mutant d'une souche K-12 dont le gène *fimH* a été interrompu par une cassette de résistance à la kanamycine.

Pour tous les tests, les bactéries ont été cultivées dans un bouillon LB (Luria-Bertani) en culture statique à 37 °C sur une période d'incubation de 48h, conditions qui favorisent l'expression des fimbriae. Pour les manipulations génétiques, sauf exceptions, les souches ont été cultivées sur géloses LB à 37 °C sur une période d'incubation de 18h ou en bouillon LB à 37 °C avec agitation.

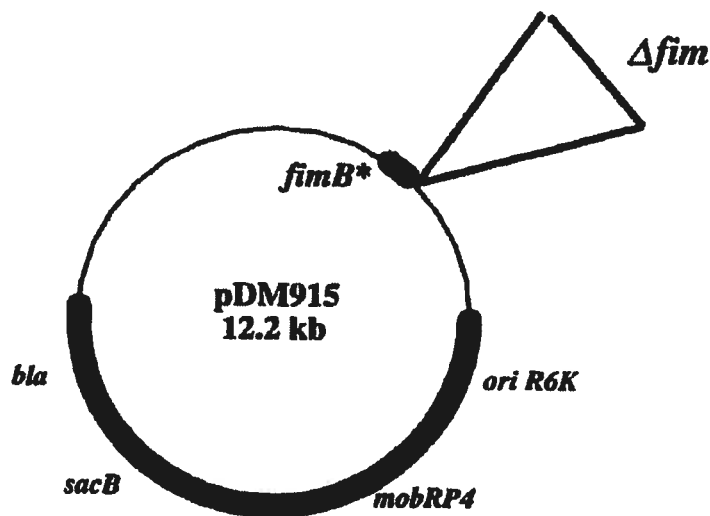
Les lignées cellulaires utilisées pour les tests d'adhérence sont les lignées T24 et HeLa, respectivement des cellules épithéliales de vessie humaine et des cellules cervicales humaines. Les cellules T24 poussent dans un milieu de culture commercial liquide McCoy's 5A modifié contenant 1,5 mM de L-glutamine et 7,5 % (p/v) de

bicarbonate de sodium, auquel est ajouté 1 M de tampon HEPES (acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique) et 10 % (v/v) de SFB (sérum fœtal bovin) préalablement inactivé à la chaleur. Le milieu de culture des cellules HeLa consiste en un milieu commercial liquide MEM (« minimum essential medium ») contenant 2 mM de L-glutamine auquel est ajouté 1,5 g/L de NaHCO<sub>3</sub>, 0,1 mM d'acides aminés non-essentiels, 1 mM de sodium pyruvate, 1 M de tampon HEPES et 10 % (v/v) de SFB préalablement inactivé à la chaleur. Pour les deux lignées, la culture s'effectue dans 25 mL de milieu de culture dans des flasques T75 et sont incubés à 37 °C à 5 % de CO<sub>2</sub>.

Des passages sont effectués trois fois par semaines lorsque les cellules ont atteint entre 80 et 100 % de confluence. Les cellules sont alors rincées puis décollées grâce à 2 mL d'une solution de trypsine-EDTA (0,25 % (p/v) trypsine, 1mM EDTA-4Na) de chez Invitrogen durant trois minutes à 37 °C. Le flasque est ensuite frappé de manière à s'assurer que les cellules décollent bien de la paroi du flasque. On ajoute ensuite 8 mL de milieu de culture à la suspension de laquelle un petit échantillon sera prélevé afin d'être coloré au bleu de trypan et déposé sur un hémacytomètre. Les cellules sont alors dénombrées et la concentration de cellules dans la suspension est calculée. Le volume nécessaire de suspension afin d'avoir  $3 \times 10^5$  cellules est ajouté à 25 mL de milieu frais dans un nouveau flasque et remis à l'incubation dans les conditions décrites précédemment.

Au moment d'effectuer un passage, il est aussi possible de préparer une plaque de 24 puits qui peut servir à effectuer des tests d'adhérence sur des cellules en culture. Lorsqu'un de ces tests est planifié, un autre volume de la suspension cellulaire est utilisé afin d'inoculer la plaque. Le volume nécessaire de suspension afin d'avoir  $2,5 \times 10^6$  cellules est transféré dans un tube et le volume nécessaire de milieu frais y est ajouté afin d'obtenir un volume final de 25 mL. Il y a finalement distribution de 1 mL par puits de cette dernière suspension pour terminer avec  $1 \times 10^5$  cellules dans chaque puits. Les plaques sont incubées dans les mêmes conditions que les flasques et arrivent généralement à confluence en 24h.

Le plasmide pDM915 illustré à la **Figure 2.1** a été utilisé pour effectuer des échanges alléliques (Marc *et al.*, 1998). Ce dernier est un plasmide suicide muni d'une origine de répllication R6K qui nécessite la présence de la protéine  $\pi$  pour initier la répllication du plasmide. On y retrouve aussi la région de mobilisation *mobRP4* permettant le transfert du plasmide par conjugaison. Le plasmide pDM915 est porteur du gène de sélection *bla* codant pour une  $\beta$ -lactamase conférant à la bactérie qui l'exprime une résistance aux antibiotiques de type  $\beta$ -lactamine tels que l'ampicilline et la carbénicilline. En plus de ce marqueur de sélection, ce plasmide possède aussi un marqueur de contre-sélection. Il s'agit du gène *sacB* qui code pour une levansucrase qui hydrolyse le sucrose en composés toxiques pour *E. coli*, permettant alors d'éliminer au besoin les bactéries possédant le plasmide en les plaçant en présence de sucrose. C'est d'ailleurs cette caractéristique qui lui confère son qualificatif de plasmide suicide. Finalement, pDM915 possède aussi une région nommée  $\Delta fim$  composée du tout début du gène *fimB* ainsi que d'une petite section du génome qui suit le gène *fimH*. Cette partie du plasmide pourra éventuellement servir de remplacement pour l'opéron entier dans les mutants qui seront créés.



**Figure 2.1** Organisation génétique du plasmide pDM915.

On retrouve sur le plasmide pDM915 une origine de répllication R6K dépendante de la protéine  $\pi$ , une région de mobilisation *mobRP4*, les marqueurs de sélection et de contre-sélection *bla* et *sacB* ainsi qu'une région  $\Delta fim$  comprenant le tout début du gène *fimB* ainsi que la région qui suit immédiatement le gène *fimH* dans le génôme bactérien (modifié de Marc *et al.*, 1998).

Un plasmide a aussi été utilisé au cours de la mutation effectuée par la technique de Datsenko et Wanner. Celui-ci, nommé pKD46, est un plasmide thermosensible et résistant à la kanamycine qui arbore les gènes  $\gamma$ ,  $\beta$  et *exo* qui font partie du système de recombinaison du bactériophage  $\lambda$  Red sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Ce système permet la protection contre les exonucléases et la recombinaison d'ADN linéaire étranger chez *E. coli* (Datsenko et Wanner, 2000).

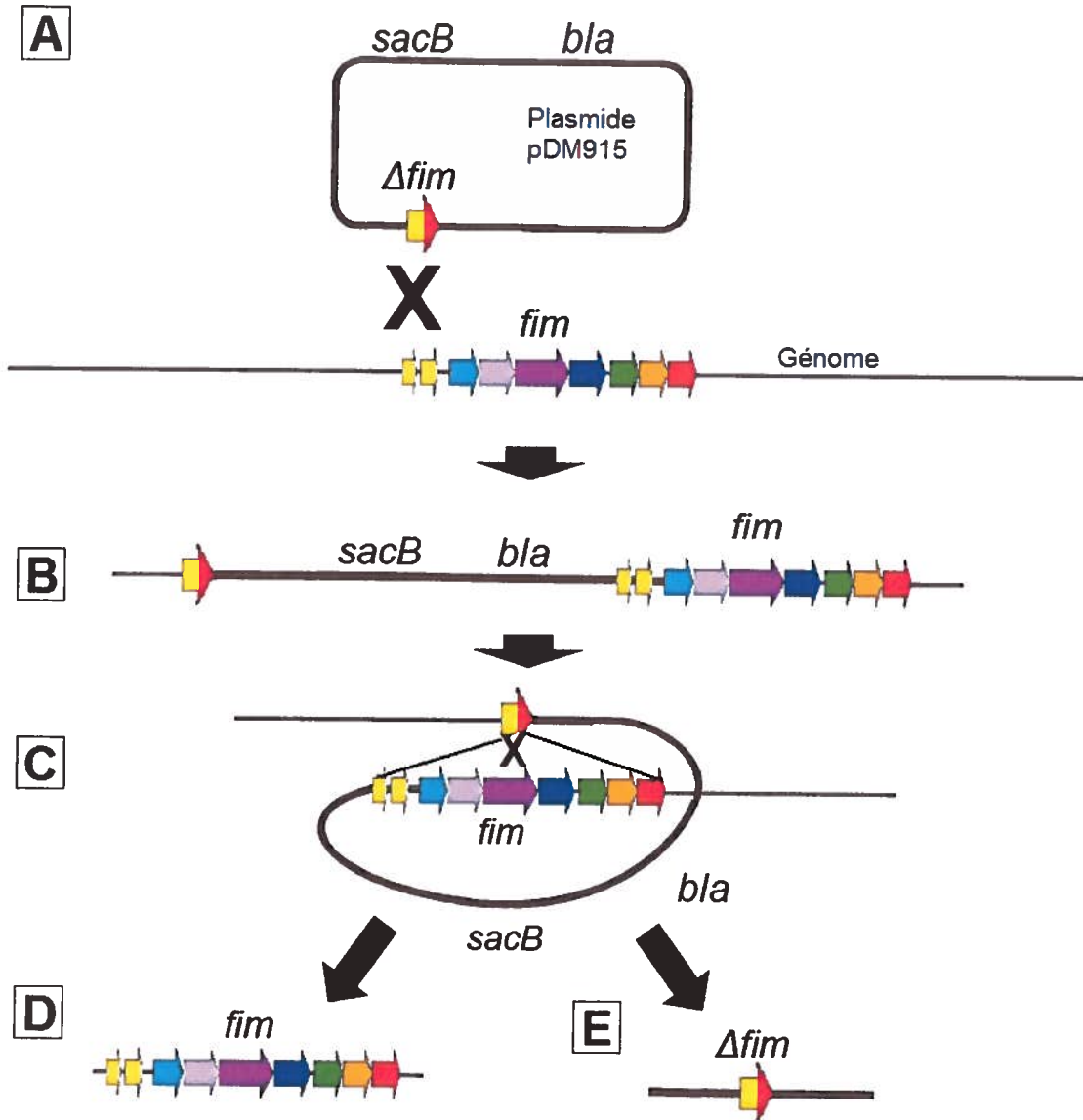
## 2.2 Création de souches mutantes

Afin d'avoir de bons contrôles génétiques pour toutes les expériences, il a été nécessaires de créer des mutants incapables de produire des fimbriae de type I à partir des souches sauvages qui seraient utilisées. L'échange allélique a été utilisé pour éliminer l'opéron *fim* en entier des souches. Cette technique fonctionne par contre difficilement sur la souche CFT073. On croit que la souche aurait peut-être un certain degré de résistance aux composés toxiques résultant de la réaction entre le sucrose et la levansucrase codée par le gène *sacB* du plasmide d'échange allélique pDM915. À cet effet, une technique différente a été utilisée pour effectuer la mutation sur cette souche. La technique de Datsenko et Wanner nous a par contre seulement permise de muter le gène *fimH* plutôt que l'opéron entier. Ceci dit, le phénotype de souches  $\Delta fim$  et  $\Delta fimH$  est tout de même être similaire. Sans la sous-unité FimH, les fimbriae sont non-fonctionnels et perdent donc toute capacité à adhérer à leurs récepteurs.

### 2.2.1 Technique de l'échange allélique

Cette technique a été utilisée pour créer des mutants  $\Delta fim$  chez les souches UCB34 et ECOR72 qui sont toutes deux des souches UPEC. Elle consiste à effectuer une mutation dans le génome bactérien en échangeant un allèle natif pour un allèle muté qui se trouve sur un plasmide suicide. Pour se faire, le plasmide doit être transféré d'une souche donneuse à la souche receveuse à muter par conjugaison (Maloy *et al.*, 1996).





**Figure 2.2** Étapes de la technique de mutation par échange allélique.

**A.** Une fois entré dans la cellule à muter par conjugaison, le plasmide doit effectuer une simple recombinaison dans le génome pour survivre puisque sa répllication en tant que plasmide est dépendante de la protéine  $\pi$  absente de la souche receveuse. **B.** Le gène *bla* permet de sélectionner les recombinants. **C.** Une seconde recombinaison doit avoir lieu afin d'éliminer la majeure partie du plasmide et de ne garder que l'allèle  $\Delta fim$ . Les doubles recombinants sont sélectionnés pour leur survie en présence de sucrose étant donné qu'ils doivent avoir perdu le gène *sacB*. La double recombinaison peut donner lieu à deux résultats. **D.** Il est possible que l'allèle natif de l'opéron *fim* soit gardé et que l'allèle muté soit rejeté. **E.** Dans le cas qui nous intéresse, l'allèle natif est rejeté et c'est l'allèle muté  $\Delta fim$  qui persiste dans le génome (inspiré de Maloy *et al.*, 1996).

### 2.2.1.1 Conjugaison

Pour débiter l'échange allélique, le plasmide devait être transféré dans les souches à muter par conjugaison tel qu'illustré en A dans la **Figure 2.2**. Pour ce faire, la souche donneuse  $\chi 7213$  a été striée sur une large bande sur des géloses LB préalablement enduites de 125  $\mu\text{L}$  de DAP 10 mg/mL. Ces géloses ont été incubées à 37 °C pour une période de 2h afin de permettre à la souche de s'accoutumer au milieu et d'effectuer quelques cycles de réplication. Une seconde large bande a ensuite été striée perpendiculairement à la première à partir de la souche receveuse. Les géloses ont finalement été incubées à 37 °C durant 18h. De plus, à titre de contrôle, une gélose LB sans DAP a été striée avec la souche donneuse  $\chi 7213$ .

### 2.2.1.2 Recombinaisons et sélections

Pour effectuer la première recombinaison, le centre de chaque croix a ensuite été resuspendu dans du bouillon LB, puis étalé sur des géloses LB contenant 100  $\mu\text{g/mL}$  d'ampicilline qui ont été mises en incubation à 37 °C pour une période de 18h. Une dizaine de colonies isolées ont ensuite été striées sur des demi-géloses LB avec amplicilline pour s'assurer d'obtenir des isolats purs. Les géloses ont une fois de plus été incubées à 37 °C sur une période de 18h. Puisque la souche receveuse à muter ne produit pas la protéine  $\pi$ , le plasmide ne peut donc pas s'y répliquer. Le principe de la simple recombinaison est illustré en B dans la **Figure 2.2**. Cette recombinaison a lieu parce que les souches receveuse ne possèdent pas le gène *pir* codant pour la protéine  $\pi$ . En absence de  $\pi$ , le seul moyen de retenir le plasmide est l'intégration par recombinaison homologue au génome bactérien. De plus, la présence d'ampicilline provoque une pression de sélection pour l'obtention d'une simple recombinaison du plasmide dans le génome, puisque les souches n'ayant pas intégré le plasmide ne résiste pas à l'antibiotique.

L'étape suivante, illustrée en C dans la **Figure 2.2**, sert à favoriser la sélection d'une deuxième recombinaison homologue permettant de garder seulement la région  $\Delta fim$  du plasmide et de perdre le reste, dont entres autres l'origine de réplication, la région de mobilisation et les gènes *bla* et *sacB*. Les bactéries n'ayant pas effectué de première recombinaison ont été éliminées à l'étape précédente. Afin d'effectuer une pression

sélective pour la double recombinaison, les bactéries restantes sont donc mises en présence de sucrose. Celles ayant toujours le gène *sacB* produisant la levansucrase ne survivent pas à cette étape, laissant alors seulement les individus ayant effectué la double recombinaison. Pour mettre en œuvre cette stratégie, des colonies isolées de chaque demi-gélose de l'étape précédente ont été resuspendues, diluées, puis étalées sur des géloses LB avec 5 % (p/v) de sucrose sans NaCl. Les géloses ont ensuite été incubées à 30 °C durant trois jours et les nouvelles colonies ont été marquées à chaque jour.

Des colonies isolées ayant poussé les trois jours ont été striées sur des demi-géloses LB sans sel avec 5 % (p/v) de sucrose et incubées à 37 °C durant 18h. Chacun des isolats a ensuite été strié sur une parcelle de gélose avec ampicilline et incubées à 37 °C durant 18h afin de s'assurer qu'elles n'ont pas gardé le gène de résistance bla. La double recombinaison de l'étape précédente peut donner deux résultats possibles, soit l'allèle muté ou un retour à l'allèle natif, illustrés respectivement en D et en E dans la Figure 2.2. Nous nous retrouvons donc avec de bonnes chances d'obtenir un mutant dans nos isolats finaux mais des étapes de confirmation par agglutination de levures et par une réaction de PCR tel que décrit à la section 2.2.3 sont nécessaires.

### **2.2.1.3 Confirmation des mutations**

#### **2.2.1.3.1 Agglutination de levures sur lames de verre**

Étant donné que les levures sont couvertes de récepteurs mannosylés, les bactéries munies de fimbriae de type 1 ont la capacité d'agglutiner des levures en solution. Le phénotype de présence ou d'absence d'agglutination de levure permet donc de savoir si la souche testée produit des fimbriae de type 1. Une solution de levures 3 % (p/v) dans du tampon phosphate salin PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) est donc effectuée à partir de levures de boulangerie de marque Fleischmann's achetées dans un magasin d'alimentation. Les tests sont effectués sur des lames de verres avec creux déposées sur de la glace. On dépose 50 µL de la solution de levure dans chaque creux et on ajoute ensuite 50 µL d'une culture à tester en bouillon. Il est aussi possible d'utiliser une colonie préalablement prélevée avec un cure-dent de bois stérile que l'on écrase dans le creux contenant la solution de levures. La formation d'agglutinats est observée après deux à trois minutes sur la glace. Une souche produisant

des fimbriae est utilisée comme contrôle positif à titre de comparaison. Les mutants n'étant pas encore confirmés, aucune souche n'est disponible à titre de contrôle négatif, par contre, en cas d'agglutination, 50  $\mu$ L de D-mannose 20 % (p/v) ou de son analogue, le  $\alpha$ -D-mannopyranoside, sont ajoutés pour s'assurer que les amas observés sont dus à une agglutination sensible au mannose. Un creux contenant du D-mannose avec une souche sauvage sert aussi de contrôle négatif.

### 2.2.1.3.2 Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

Dans le but d'être soumis à une réaction de polymérisation en chaîne (PCR), un échantillon de tous les mutants potentiels a été lysé. Pour ce faire, pour chaque échantillon, une colonie a été prélevée d'une gélose à l'aide d'un cure-dent stérile et écrasée dans le fond d'un tube de plastique de 1,5 mL stérile contenant 25  $\mu$ L de NaOH 0,5 M. Ensuite, 25  $\mu$ L de Tris-HCl 1 M à pH 7,5 ont été ajoutés et les tubes ont été laissés à la pièce pendant 10 minutes. Pour terminer le lysat, 450  $\mu$ L d'eau milliQ filtrée est ajoutée au tube.

Afin de déterminer si l'opéron *fim* est présent ou non chez nos mutants potentiels des souches ECOR72 et UCB34, des amorces de PCR permettant d'amplifier une région près du centre de l'opéron, à l'intérieur du gène *fimC* ont été utilisées. Il s'agit des amorces nommées FIMC F (5'- TCT GCT TGC TGG CAG GT-3') et FIMC R (5'- GCT TCC TGC ATC AGA AGG -3') qui donnent un produit de PCR de près de 600 paires de bases. La présence de ce segment à la fin de l'analyse révélerait que la mutation n'a pas eu lieu. L'absence du segment indique la délétion de la région *fim* et donc la confirmation d'un mutant  $\Delta$ *fim*.

En plus des souches mutantes potentielles, une souche sauvage est testée en tant que contrôle positif. Une réaction effectuée avec de l'eau au lieu d'un lysat sert aussi de contrôle de la contamination. Pour chaque réaction de PCR effectuée dans un tube de plastique de 200  $\mu$ L, il doit y avoir 5  $\mu$ L de lysat, 1  $\mu$ L de dNTP 10 mM, 0,2  $\mu$ L d'ADN polymérase *Taq* de Invitrogen, 5  $\mu$ L de tampon 10X Invitrogen fourni spécifiquement pour la polymérase *Taq* utilisée ici, 2  $\mu$ L de chaque amorce à 6,25  $\mu$ M et 34,8  $\mu$ L d'eau milliQ filtrée. Les tubes placés dans le thermocycleur passent par 30 cycles identiques de trois étapes. La dénaturation à 94 °C dure de 30 secondes à une minute et permet de

séparer les doubles brins d'ADN. L'étape d'hybridation permet aux amorces de se coupler à leurs régions d'ADN complémentaires génomiques afin de se préparer à reproduire ce segment. Cette étape dure 30 secondes et sa température est déterminée en fonction des amorces utilisées. Dans le cas des amorces FIMC utilisées ici, la température choisie est de 56 °C. Suit alors l'étape d'élongation où l'ADN polymérase ajoute rapidement des nucléotides aux nouveaux brins afin de les compléter. Cette étape est effectuée à 72 °C et sa durée peut varier en fonction de la longueur du segment à amplifier. Dans le cas décrit ici où le segment comporte environ 600 nucléotides, la durée d'élongation est d'une minute.

Afin de visualiser la présence ou l'absence d'un produit de PCR et d'en connaître la taille approximative, le contenu des tubes doivent migrer sur un gel d'agarose. Un gel de 50 mL à 1 % (p/v) d'agarose dans un tampon TBE (89 mM tris, 89 mM borate, 2 mM EDTA) a donc été préparé et chauffé une minute au micro-onde. Avant de couler la solution dans un support à gel contenant un peigne qui permet de mouler les puits, 3 µL de bromure d'éthidium 10 mg/mL sont ajoutés. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant qui marque ainsi les acides nucléiques, nous permettant de les observer lorsqu'exposés à des rayons ultraviolets. Une fois refroidi et solidifié, le gel est placé dans une cuve à migration contenant du tampon TBE.

Chaque produit de PCR à migrer est ensuite chargé dans le gel avec 5 µL de tampon de migration. Ce tampon consiste en 0,25 % (p/v) de bromophénol solubilisé dans du glycérol. Le glycérol sert à alourdir les échantillons, leur permettant de rester au fond des puits avant que la migration commence. Le bleu de bromophénol quant à lui est un colorant qui migre à la même vitesse que les tout petits fragments d'ADN dans un gel d'agarose, nous permettant alors de suivre le front de migration tout au long de l'électrophorèse. En plus des échantillons, une échelle de poids moléculaire de la compagnie NEB nommée 2-log combinée à du tampon de migration est aussi chargée dans un puits du gel. Finalement la migration est démarrée et un courant de 120 volts parcourt le gel pendant 60 minutes. Le gel est ensuite retiré de la cuve pour être pris en photo sous des rayons ultraviolets afin d'être analysé.

## 2.2.2 Technique de Datsenko et Wanner

Cette méthode de mutation développée en 2000 consiste à l'inactivation en une étape de gènes chromosomaux chez *E. coli* grâce à l'utilisation de produits de PCR sans passer par l'intermédiaire d'un plasmide. Le gène à muter est ainsi remplacé par une version du même gène préalablement interrompu par une cassette de résistance à un antibiotique tel que la kanamycine. L'utilisation de produits de PCR dans la mutation chez *E. coli* n'était pas courante avant l'établissement de cette méthode puisque *E. coli* produit naturellement des exonucléases qui s'attaquent aux ADN linéaires dans le cytoplasme. Cet important obstacle a été surmonté par Datsenko et Wanner en introduisant dans la souche à muter un plasmide assistant qui contient le système de recombinaison du bactériophage  $\lambda$  Red. Ce système de recombinaison est composé des gènes  $\gamma$ ,  $\beta$  et *exo* placés sous le contrôle d'un promoteur inductible à l'arabinose. Ces gènes codent respectivement pour les protéines Gam, un inhibiteur de l'exonucléase V de *Escherichia coli*, ainsi que les recombinases Bet et Exo. Grâce à ces trois protéines, un fragment d'ADN linéaire introduit dans une cellule où le plasmide est induit sera protégé et poussé vers la recombinaison. De plus, ce plasmide assistant est aussi thermosensible et résistant à l'ampicilline, ce qui facilite son élimination ainsi que l'utilisation du phénotype de sensibilité à l'antibiotique démontrant sa perte (Datsenko et Wanner, 2000). Cette technique a été utilisée pour effectuer une mutation  $\Delta fimH$  dans CFT073 étant donné que la technique de l'échange allélique fonctionne mal avec cette souche.

Le gène muté utilisé pour remplacer le gène *fimH* natif de CFT073 est celui de la souche QT1069 dont le gène *fimH* a été interrompu par une cassette de résistance à la kanamycine. Afin d'obtenir de grandes quantités de ce gène interrompu, il a été amplifié par PCR grâce à six réactions identiques dans des tubes différents. La méthode d'amplification par PCR a été décrite en détail à la section 2.2.1.3.2. Dans ce cas si, les amorces qui ont été utilisées sont FimH\_F (5'-AAT ACT GGC GCA ACC AAA AC-3') et FimH\_R (5'-GCC TAC AAA GGG CTA ACG TG-3'). Les conditions d'amplification ont été les mêmes que dans la section précédente à l'exception de la température d'hybridation qui était de 52 °C et la migration qui s'est fait sur un gel à 0,6 % (p/v) d'agarose. La densité du gel a été réduite car le fragment attendu n'était pas de la même

taille. Après la migration des réactions, les bandes obtenues ont été découpées du gel grâce à une lame. Les produits de PCR ont été extraits du gel d'agarose grâce au QIAquick Gel Extraction Kit de Qiagen selon les instructions du fabricant avant d'être tous combinés dans le même tube. L'extrait ainsi obtenu a ensuite été purifié grâce au QIAquick PCR Purification Kit de Qiagen selon les instructions du fabricant.

Afin d'introduire des copies de l'allèle muté dans la souche sauvage par électroporation, la souche CFT073 possédant le plasmide pKD46 a dû être correctement préparée à la procédure. La souche a d'abord été cultivée en bouillon LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline et 50 mM d'arabinose à 30 °C avec agitation jusqu'à l'obtention d'une densité optique à 600 nm de 0,75. Les cellules ont ensuite été centrifugées afin d'obtenir un culot et de jeter le surnageant de milieu. Les bactéries ont ensuite été resuspendues dans une solution de glycérol 10 % (v/v), puis re-centrifugées. Ce lavage au glycérol a été répété trois fois et le culot final a été délié par agitation au vortex. Ces cellules rendues électrocompétentes ont finalement été électroporées à 1,8 kv, à 25 µF, à 200 Ω en présence du produit de l'amplification du gène *fimH* interrompu par le gène de résistance à la kanamycine. Cette impulsion électrique perméabilise la membrane bactérienne permettant alors à l'ADN de la traverser. Les cellules ont ensuite rapidement été immergées de bouillon LB puis incubées à 37 °C avec agitation durant deux heures afin de permettre aux membranes de se régénérer durant la recombinaison. Cette culture en bouillon a enfin été étalée sur des géloses LB contenant 50 µg/mL de kanamycine qui ont été incubées à 37 °C durant 18 heures dans le but de sélectionner les bactéries qui ont acquis la résistance à cet antibiotique.

Puisque le plasmide assistant est thermosensible, l'incubation à 37 °C l'a éliminé. Les bactéries ayant poussé en présence de kanamycine sont tout de même striées en parcelles sur une gélose contenant de l'ampicilline afin de s'assurer qu'elles ont perdu la capacité d'y résister. Les colonies résistantes à la kanamycine et sensibles à l'ampicilline sont donc considérées comme des mutants potentiels pour *fimH* qui devront être confirmées par des tests d'agglutination de levures et par PCR tel que décrit à la section 2.2.1.3. Le test de confirmation par PCR est effectué avec les mêmes amorces et les mêmes conditions que lors de l'amplification du gène *fimH* interrompu effectuée au début de cette présente section.

## 2.3 Molécules inhibitrices d'adhérence

Malgré que les raisonnements par rapport aux différentes structures chimiques seront laissés aux chimistes et ne font pas partie de cette étude, les caractéristiques des différentes molécules utilisées au cours des tests sont tout de même exposées ici dans le tableau 2.1 et des schémas de ces molécules se retrouvent aux **Figure 2.3 à 2.5**. Les molécules commerciales ainsi que les celles synthétisées, purifiées et fournies par l'équipe de René Roy afin d'être testées ont toutes été solubilisés dans du tampon PBS à différentes molarités à partir de l'état de poudre selon les besoins.

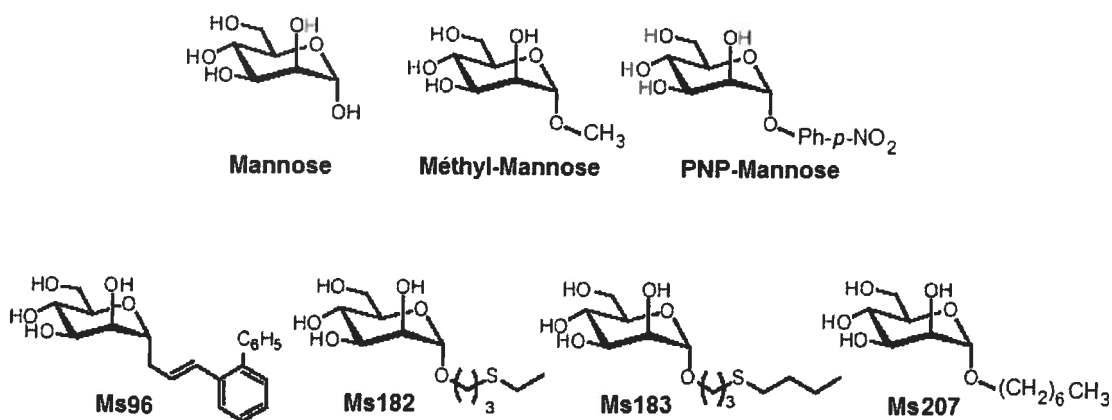
**Tableau 2.1** Caractéristiques des inhibiteurs d'adhérence.

Nom	Poids moléculaire (g/mol)	Unités mannosylées	Série
Mannose	180,16	1	Commercial
Méthyl-Mannose	194,18	1	Commercial
p-nitrophényl-Mannose	301,25	1	Commercial
Ms96	356,41	1	Monomère
Ms182	282,35	1	Monomère
Ms183	310,41	1	Monomère
Ms207	278,34	1	Monomère
DM13	865,79	3	Pentaérythritol
DM6	1109,01	4	Pentaérythritol
DM80	1285,22	4	Pentaérythritol
PAP46	1933,84	6	Pentaérythritol
DM65	1854,73	6	Pentaérythritol
DM71	1713,57	6	Pentaérythritol
DM104	2333,02	6	Cyclotriphosphazène
DM125	2333,01	6	Cyclotriphosphazène
DM117	5041,64	12	Cyclotriphosphazène
DM131	4236,78	12	Cyclotriphosphazène
DM133	5960,4	18	Cyclotriphosphazène



### 2.3.1 Les monomères

Le D-mannose et le méthyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside, aussi appelés plus simplement mannose et méthyl-mannose, sont les inhibiteurs d'adhérence qui ont été utilisés comme contrôles à titre de comparaison avec les glycodendrimères mannosylés à tester. Parmi les molécules que l'équipe de René Roy a synthétisées pour cette étude, quatre ne comportent qu'une seule unité mannosylée. Ces quatre molécules illustrées à la **Figure 2.3** sont dérivées d'une molécule de mannose à laquelle un radical différent a été ajouté. Ms96 est la seule molécule monomérique à posséder un radical cyclique. Ms182, Ms183 et Ms207 ont toutes comme radical des chaînes de carbones de différentes longueurs. De plus, Ms182 et Ms183 ont un atome de soufre intégré dans leurs chaînes radicales. Le p-nitrophényl-mannose ou PNP-mannose est une molécule disponible commercialement que nous allons aussi tester au même titre que les molécules créées par l'équipe de René Roy.

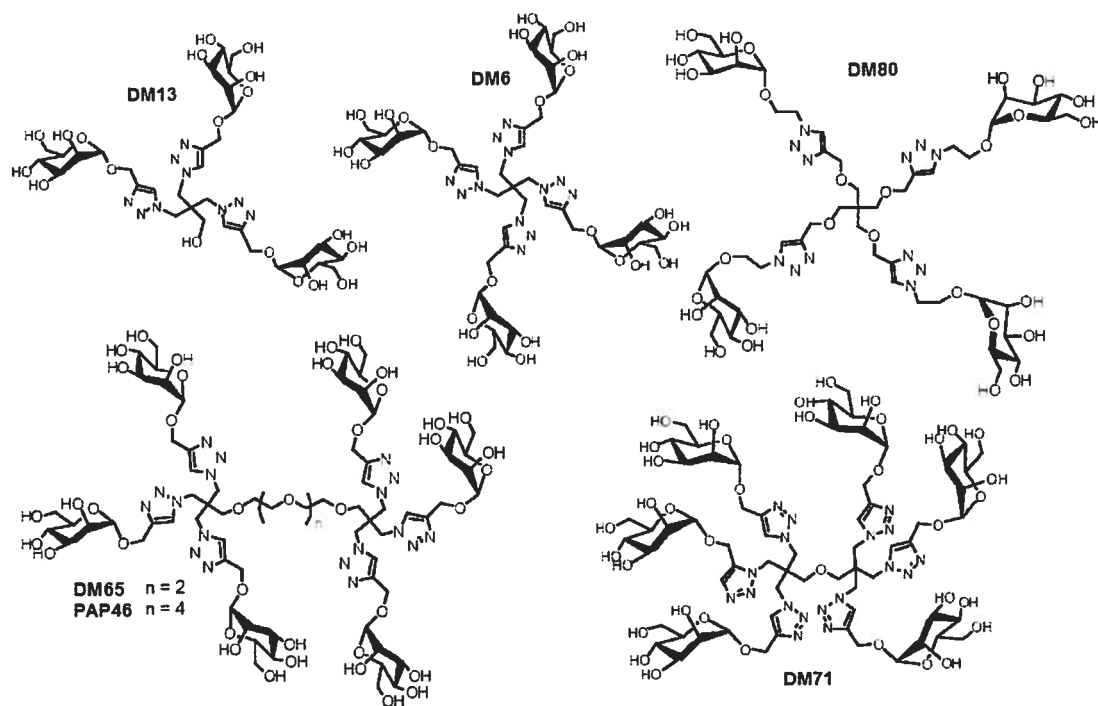


**Figure 2.3** Inhibiteurs monomériques.

La première molécule illustrée ici représente le simple mannose tel que retrouvé à l'état naturel. Les six autres molécules sont des dérivés du mannose auquel on a ajouté différents radicaux. Le méthyl-mannose et le PNP-mannose sont des molécules disponibles commercialement alors que les quatre dernières molécules ont été imaginées et synthétisées par l'équipe de René Roy.

### 2.3.2 La série des pentaérythritols

Le pentaérythritol ( $C(CH_2OH)_4$ ) est un alcool tétrahydrique composé de quatre groupements  $CH_2OH$  reliés à un carbone central (Marrian, 1948). Ce composé est fréquemment utilisé dans la composition de résines, de vernis, de stabilisateurs de chlorure de polyvinyle et de plusieurs autres produits (Touaibia et Roy, 2007). Dans cette étude, cinq molécules synthétisées par le groupe de René Roy comportent des molécules de mannose reliées par différentes chaînes à un cœur de pentaérythritol et elles sont toutes illustrées à la **Figure 2.4**. DM13 n'a que trois unités de mannose reliées à différents groupements  $(CH_2OH)_4$ , laissant libre le quatrième groupement de ce type. DM6 est similaire à DM13 mais avec un mannose supplémentaire sur le quatrième groupement



**Figure 2.4** Inhibiteurs avec un cœur composé de pentaérythritols.

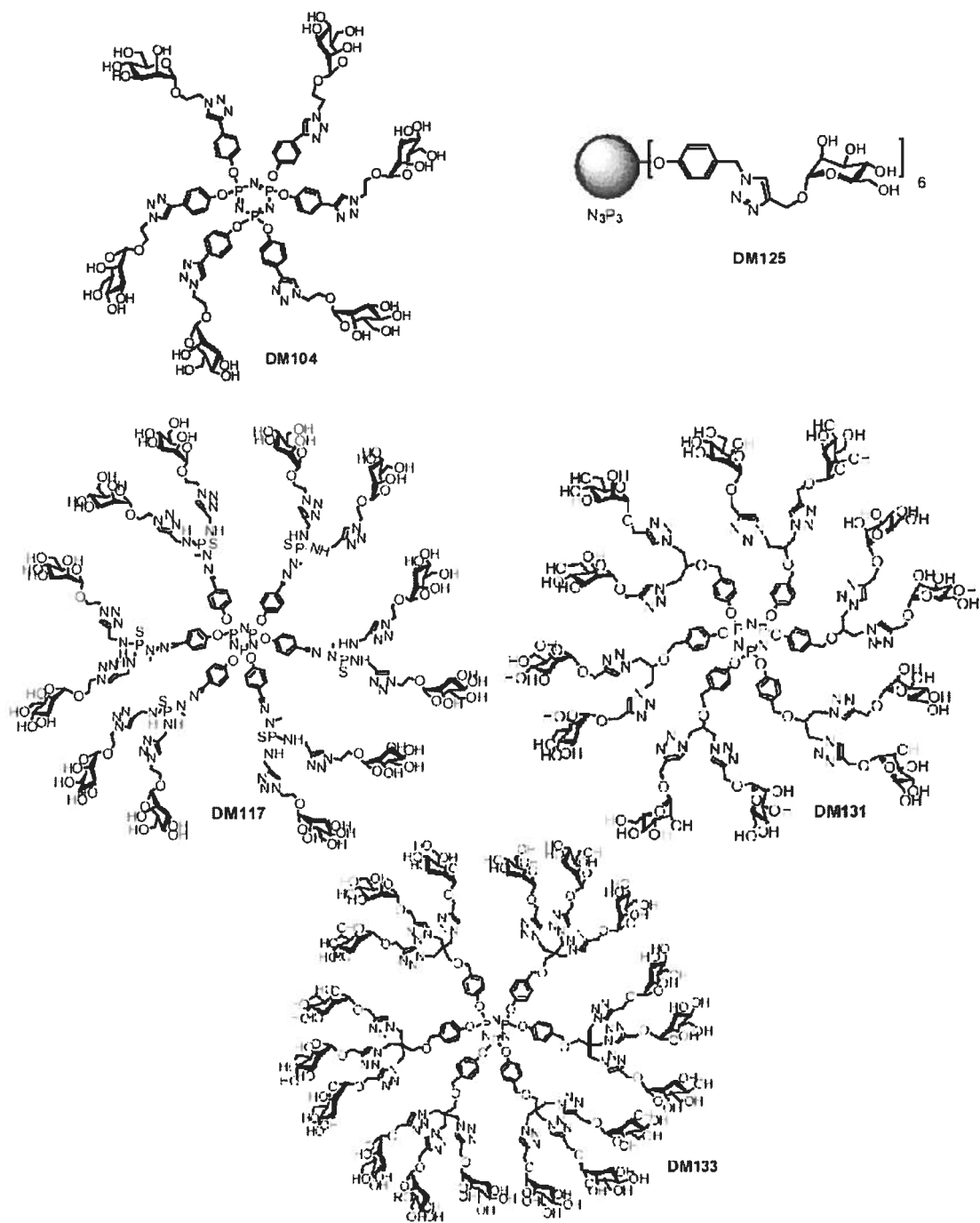
Les molécules de cette série ont toutes soit une ou deux molécules de pentaérythritols en tant que cœur. On y retrouve des molécules à trois, quatre ou six unités mannosylées. La longueur des chaînes reliant les mannoses au cœur ou reliant les deux pentaérythritols ensemble peut varier d'une molécule à l'autre.

(CH<sub>2</sub>OH)<sub>4</sub>. DM80 a aussi un mannose par groupement mais les chaînes les reliant ensemble sont plus longues et un peu plus complexes que pour les deux molécules précédentes. Finalement les molécules DM65, DM71 et PAP46 consistent toutes en deux molécules DM13 reliées entre elles par leurs groupements (CH<sub>2</sub>OH)<sub>4</sub> libres grâce à des chaînes hydroxyles de différentes longueurs.

### 2.3.3 La série des cyclotriphosphazènes

Les molécules de cette série ont toutes un cœur contenant un seul Cyclotriphosphazène composé d'un cycle de trois atomes d'azote et trois atomes de phosphate. On retrouve deux chaînes latérales par atome de phosphate. Ces chaînes varient sur leurs longueurs, leurs compositions et leurs degrés de ramification, donnant lieu à cinq molécules différentes de cette série qui seront analysées dans cette étude et qui sont illustrées à la **Figure 2.5**. DM104 et DM125 sont deux molécules très similaires à une unité mannosylée par embranchement pour un total de six unités mannosylées. Le seul détail qui différencie ces deux molécules est une légère variation dans l'orientation d'un cycle azoté faisant partie des chaînes reliant les molécules de mannose au cœur de Cyclotriphosphazène. Les molécules DM117 et DM131 portent quant à elles deux molécules de mannose par branche, portant alors le total à 12 unités mannosylées par inhibiteurs d'adhérence. Ce qui distingue DM131 de DM117 est l'ajout de quelques atomes d'azote, de phosphate et de soufre à divers endroits dans les embranchements. Finalement, DM133 est la molécule faisant partie de l'étude qui comporte le plus d'unités mannosylée avec un total de 18 à raison de trois mannoses par branches.

Les molécules de la série des cyclotriphosphazènes possèdent plusieurs avantages par rapports à celles de la série des pentaérythritols. En plus d'avoir des propriétés chimiques et thermales particulièrement intéressantes, les cyclotriphosphazènes peuvent tous être synthétisés de façon beaucoup plus efficace par une technique de chimie « click ». Sans entrer dans les détails de cette procédure, il est intéressant de savoir que le rendement de production des cyclotriphosphazènes est beaucoup plus élevé et la synthèse donne lieu à beaucoup moins de sous-produits (Touaibia et Roy, 2008).



**Figure 2.5** Inhibiteurs avec un cœur composé de cyclotriphosphazène.

Un cœur de cyclotriphosphazène est composé d'un centre cyclique de trois atomes d'azote et trois atomes de phosphate. Chacun des atomes de phosphate sont surmontés par des chaînes dont la longueur, la composition et le degré de ramification varient d'une molécule à l'autre. Les inhibiteurs de cette série ont donc de six à 18 unités de mannose attachées à des chaînes plus ou moins azotées, phosphatées et soufrées.

## 2.4 Infections dans le modèle murin

### 2.4.1 Co-infections montrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation

Tel qu'abordé dans la section 1.6.5.1.1 portant sur les fimbriae de type 1, il a été confirmé plus d'une fois dans la littérature que ces fimbriae étaient importants pour la virulence des UPEC. Afin de déterminer si différentes souches UPEC dépendent de la même façon des fimbriae de type 1 dans leurs pathogénèse, des co-infections dans un modèle d'ITU murin ont été effectuées. Les souches déficientes pour les fimbriae de type 1 entiers ou pour leur adhésine ont toutes été mises en compétition contre leurs souches isogènes arborant des fimbriae de type 1 fonctionnels mais mutantes pour les gènes *lacZYA*. Ces souches mutantes que l'on nommera simplement  $\Delta lac$  sont utilisées comme souches compétitrices puisqu'elles sont aussi virulentes que les souches sauvages isogènes, mais permettent de facilement distinguer les souches mises en compétition sur un milieu de culture MacConkey. Ce milieu contenant du lactose et un indicateur de pH qui colore les bactéries capables de dégrader le lactose par fermentation car ce procédé produit de l'acide. Les colonies des souches testées  $\Delta fim$  ou  $\Delta fimH$  sont donc rouges sur des géloses MacConkey contrairement aux souches  $\Delta lac$  qui restent translucides sur le même milieu. La procédure qui suit est basée sur le modèle murin établi par Hagberg et son équipe (Hagberg *et al.*, 1983).

#### 2.4.1.1 Préparation de l'inoculum

Les trois souches testées CFT073 $\Delta fimH$ , ECOR72 $\Delta fim$  et UCB34 $\Delta fim$ , ainsi que leurs souches compétitrices respectives CFT073 $\Delta lac$ , ECOR72 $\Delta lac$  et UCB34 $\Delta lac$  ont toutes été cultivées en précultures de 10 mL de bouillon LB inoculées à partir de colonies et incubées à 37 °C pendant 18h avec agitation. Pour chaque souche, 4 mL de préculture ont servi à inoculer 200 mL de bouillon LB ensuite incubé à 37 °C pendant 48h sans agitation pour favoriser la production de fimbriae de type 1. Afin de déterminer si ces conditions de cultures pour un inoculum à infection allaient affecter la virulence des souches, une comparaison avec des conditions de cultures plus standards s'imposait. Les souches ECOR72 $\Delta fim$  et ECOR72 $\Delta lac$  ont donc aussi été inoculées dans 200 mL de

bouillon LB mais cette fois-ci l'incubation à 37 °C a été effectuée avec agitation pendant seulement 18h à titre comparatif.

Une fois les inocula cultivés, chaque paire de souches compétitrices étaient mélangées uniformément et réparties dans des tubes coniques de 50 mL pour être centrifugés. Les surnageants ont été jetés afin de concentrer les échantillons le plus possible. Les culots ont ensuite été resuspendus et rassemblés, puis homogénéisés à l'aide d'un vortex. Les tubes contenant les inocula ont été maintenus sur la glace jusqu'à utilisation. Un petit échantillon de 10 µL de ces cultures concentrées a été prélevé pour être dilués plusieurs fois afin d'être étalé sur des géloses MacConkey en duplicata. Ces géloses sont ensuite incubées à 37 °C durant 18h pour que les colonies y soient comptées et que les concentrations bactériennes des inocula soient calculées.

#### **2.4.1.2 Anesthésie des souris**

Les souris utilisées étaient des femelles de 12 semaines de la lignée CBA/J. Un total de 50 souris ont été utilisées dans cette expérience de co-infections. Comme trois souches ont été testées et qu'une souche était testée en deux conditions de croissance différentes, quatre groupes de 12 ou 13 souris ont été formés. Le mélange d'anesthésiant utilisé était composé de kétamine, de xylazine et d'acépromazine. Une injection de 20 µL a été donnée à chaque souris de façon intrapéritonéale. Immédiatement après l'anesthésie, chaque souris était identifiée grâce à un code de marquage au poinçon à l'oreille. Les souris étaient considérées anesthésiées lorsqu'elles n'avaient plus de réflexe lorsqu'elles étaient pincées aux extrémités des pattes.

#### **2.4.1.3 Inoculation des souris**

Une fois bien anesthésiées, les souris étaient prêtes à l'inoculation. Afin d'injecter l'inoculum directement dans la vessie, un segment de tube de polyéthylène stérile d'environ 3 cm de long a été utilisé pour cathétériser les souris. Deux pinces stériles à bouts fins ont été utilisées pour la manœuvre. La première servait à tendre la peau de la région périurétrale et l'autre, à insérer le cathéter dans l'urètre. Une longueur de 10 à 15 mm de cathéter a été inséré dans l'urètre, jusqu'à ce qu'une petite résistance se fasse sentir. Une seringue de verre de 100 µL a alors été remplie d'inoculum et une

aiguille de calibre 30 G a été placée à son extrémité. Une fois l'air évacué de l'aiguille, celle-ci a été insérée dans l'extrémité sortante du cathéter préalablement installé à la souris. Un volume de 20  $\mu$ L d'inoculum est finalement lentement injecté dans la vessie. La quantité précise de bactéries par dose est calculée selon le résultat du compte viable mis à l'incubation juste avant l'infection des rongeurs, mais un volume de 20  $\mu$ L d'inoculum concentré correspond à environ  $5 \times 10^9$  bactéries. Lorsque l'injection est terminée, le cathéter est doucement retiré et la souris est replacée dans sa cage en attendant son réveil. Les souris sont ensuite visitées régulièrement afin de s'assurer qu'aucune d'entre elles ne subissent de complications.

#### **2.4.1.4 Nécropsie et prélèvement des organes**

Après une période d'infection de 48h, les souris devaient être sacrifiées afin que les organes du système urinaire soient prélevés. Avant d'être euthanasiées, les souris ont été anesthésiées exactement comme à la section 2.5.1.2. Une fois qu'elles ont eu perdu tout réflexe aux pattes, elles ont été placées dans une chambre de plastique étanche dans laquelle a été introduit du CO<sub>2</sub>. Une fois les souris décédées, elles devaient être disséquées assez rapidement afin qu'elles ne durcissent pas. Une fois le péritoine exposé, la vessie a été isolée. Avant de la retirer, un écouvillon stérile a été frotté sur l'organe ainsi que ses environs pour ensuite être placé dans un tube stérile contenant 2 mL de tampon BSG (145 mM NaCl, 2,2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4,2 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 100 mg/mL gélatine). Le tube a été placé sur la glace afin de déterminer plus tard si la cavité péritonéale avait été infectée. L'organe a alors été retiré et placé dans un tube stérile sur la glace. Les tubes utilisés pour les organes avaient tous été pesés et identifiés à l'avance afin de faciliter la pesée des organes. La même procédure est ensuite appliquée au rein gauche et finalement au rein droit. Chaque souris ont ainsi été disséquées et leurs organes urinaires prélevés.

#### **2.4.1.5 Traitement des organes et prise des résultats**

Les organes ont été pesés un à un et ont été immergés dans un volume de tampon BSG équivalent à quatre fois leurs poids. Ces organes ont ensuite été broyés, puis dilués en séries pour être finalement étalés en duplicata à trois différentes dilutions sur des géloses MacConkey. Toutes les géloses ont été incubées à 37 °C durant 18h et les

colonies blanches et rouges ont été indépendamment dénombrées. Les UFC par gramme d'organe ont été calculés pour les colonies blanches et rouges, pour les reins et les vessies de chaque souris. Un index de compétition (IC) est finalement déterminé en calculant le ratio de bactéries déficientes pour les fimbriae de type 1 ou leur adhésine par rapport au nombre de bactéries  $\Delta lac$ . Afin de faciliter l'observation des données, les résultats rapportés sont les logarithmes des index de compétition.

## 2.4.2 Mono-infections avec un inhibiteur d'adhérence

Une série d'infections dans le modèle murin a servi à tester l'efficacité de prévention de l'établissement d'une infection *in vivo* de DM125, un glycodendrimère conçu par le laboratoire de René Roy. La procédure pour les mono-infections avec l'inhibiteur d'adhérence est sensiblement la même que pour les co-infections décrites précédemment à quelques détails près.

Deux groupes de 10 souris ont été infectés avec la souche CFT073. L'inoculum a été préparé de la même façon qu'à la section 2.5.1.1 mis à part que seulement une souche a été cultivée et utilisée pour les infections. Un volume de 500  $\mu\text{L}$  du culot final a été placé dans deux tubes de plastique différents. 750  $\mu\text{L}$  d'une solution de DM125 8,3 mM dans du PBS a été ajouté au premier tube afin d'obtenir une concentration finale de DM125 de 5 mM. Ce tube servira d'inoculum pour le premier groupe de souris. Un volume de 750  $\mu\text{L}$  de PBS a été ajouté au second tube qui lui, servira d'inoculum à l'autre groupe.

Les étapes subséquentes, de l'anesthésie jusqu'à la prise des résultats, ont eu lieu de la même façon que décrit aux sections 2.5.1.2 à 2.5.1.5. Les seuls changements effectués sont au niveau du volume inoculé qui est passé de 20  $\mu\text{L}$  à 50  $\mu\text{L}$  et de la période d'infection qui a duré 24 h plutôt que 48 h. De plus, toutes les colonies dénombrées étaient rouges puisqu'aucune souche déficiente pour l'opéron *lac* n'était utilisée. Les résultats ont donc été compilés en UFC par gramme d'organes sur une échelle logarithmique.



## 2.5 Agglutination de levures en microplaques

Les premiers tests d'efficacité des glycodendrimères ont été effectués grâce à une méthode d'agglutination de levures. Ce test a eu lieu dans des microplaques en plastique de 96 puits à fonds ronds qui ont du rester sur la glace du début à la fin de la procédure. De plus, toutes les molécules inhibitrices d'adhérence ont été testées avec les souches CFT073, ECOR72 et UCB34.

Lors des tests, tous les puits contiennent, 15  $\mu$ L d'une solution de levures 3 (v/v) telle que décrite à la section 2.2.3.1 ainsi qu'un volume égal de culture bactérienne en bouillon d'une densité optique à 600 nm de 1,0. Chaque puits contient aussi 15  $\mu$ L de l'inhibiteur à l'épreuve dilué en série dans un tampon PBS afin de tester différentes concentrations dans la même plaque. Les souches mutantes CFT073  $\Delta fimH$ , ECOR72  $\Delta fim$  et UCB34 $\Delta fim$  servent de contrôles négatifs d'agglutination. Le méthyl-mannose quant à lui sert de contrôle positif d'inhibition de l'agglutination et le PBS seul sert de contrôle positif d'agglutination.

Les résultats sont observés après une période de deux heures passées sur la glace. Le titre est considéré comme la concentration minimale d'une molécule capable d'inhiber complètement l'agglutination des levures en présence de bactéries. Afin de pouvoir comparer entre eux les résultats d'expériences réalisées à différents moments, l'efficacité a été déterminée en faisant le rapport du titre de l'inhibiteur testé par le titre du méthyl-mannose obtenu au cours de la même expérience. En fin, pour mettre en évidence l'effet du nombre d'unités de mannose pour chaque inhibiteur, l'efficacité par unité a été calculée en divisant l'efficacité par le nombre d'unités mannosylées.

## 2.6 Tests d'adhérence

### 2.6.1 Cellules en culture

Ce test a été l'objet de plusieurs mises au point qui ont toutes échouées. Les paragraphes qui suivent décrivent donc les principales étapes effectuées au cours de tests d'adhérence sur des cellules en culture.

Les tests d'adhérence sur des cellules en cultures sont entièrement réalisés sous une hotte biologique. Les cellules T24 ou HeLa ont préalablement été cultivées dans des plaques 24 puits tel qu'expliqué à la section 2.1. Tous les puits ont ensuite été doucement vidés grâce à une pompe à vide puis remplis de milieu de culture frais afin d'éliminer toutes cellules mortes non-adhérentes. L'inoculum bactérien d'une multiplicité d'infection de 1:10 à 1:100 ainsi que des inhibiteurs d'adhérence peuvent ensuite être ajoutés à ce milieu frais de façon concentrée dans un volume déterminé ou bien y être mélangé à l'avance. L'inoculum bactérien doit aussi subir une dilution en série et un étalement sur géloses LB afin de servir de base de comparaison aux nombres de bactéries qui seront récoltés à la fin du test.

La période d'incubation à 37 °C dure donc de 30 à 90 minutes et est suivi de plusieurs lavages des cellules grâce à du milieu frais, à du PBS ou à une solution saline souvent utilisé en culture cellulaire (« Hank's balanced salt solution »). Après les lavages, 1 mL d'une solution de lyse composée de PBS-DOC 0,1 % (p/v) est ajouté à chaque puits afin de lyser les cellules eucaryotes. Après une incubation de cinq minutes, les cellules bactériennes sont récoltées grâce à une pipette pour ensuite être diluées en série puis étalées sur des géloses LB. Les géloses sont ensuite incubées à 37 °C durant 18 h et les colonies peuvent y être dénombrées. Les résultats sont finalement présentés en pourcentages par rapport à la quantité de bactérie inoculée à chaque puits au départ.

## **2.6.2 Coupes congelées d'organes**

### **2.6.2.1 Récolte et coupe des organes**

Afin de récolter des organes pour effectuer des tests d'adhérence *in vitro*, cinq poulets et trois souris sains ont été sacrifiés. La dissection des souris a eu lieu exactement tel que décrit à la section 2.5.1.4, excepté que les vessies et les reins retirés n'ont pas été placés dans des tubes mais plutôt dans des petites cupules de plastiques contenant un gel protecteur de tissus pour la congélation Tissue-Tek OCT. La procédure de dissection effectuée pour les souris a été adaptée aux poulets juvéniles Leghorn blancs utilisés, mais les organes récoltés dans ce cas-ci ont été ceux des systèmes respiratoire et intestinal plutôt qu'urinaire. Des sections de trachée, de poumon, de gésier, de duodénum, de jéjunum, d'iléon, de caecum et de colon ont donc été placées dans des petites cupules de

plastiques contenant du gel Tissue-Tek OCT tout comme les vessies et reins murins. Une fois tous les organes bien immergés dans le gel, le fond des cupules a été mis en contact avec de l'azote liquide afin d'obtenir une congélation pratiquement instantanée. Les cupules congelées ont été maintenues sur la glace sèche jusqu'à leur entreposage à -80 °C.

Les organes ont été coupés en tranches de 5 µm à l'aide d'un appareil cryostat Miles 4553. Les tranches étaient déposées sur des lames de verre de microscopes faites par Fisher Scientific et qui ont un côté spécialement traité pour attirer les sections de tissus congelés. Sur chaque lame était placé trois coupes successives du même organe. Les lames peuvent être préparées à l'avance et maintenue à -30 °C en attendant leur utilisation.

### **2.6.2.2 Marquage des bactéries**

Afin de faciliter l'observation de l'adhérence aux tissus, les bactéries utilisées pour les tests ont été marquées à l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) de chez Sigma. Ce composé est un marqueur fluorescent qui peut être absorbé par les bactéries et qui émet de la lumière verte à 520 nm lorsqu'il est excité à une longueur d'onde de 490 nm (bleu). Les tests ont été effectués avec CFT073 et CFT073 $\Delta$ *fimH*, une souche UPEC et son dérivé, pour les tissus murins et avec  $\chi$ 7122 et  $\chi$ 7279 ( $\chi$ 7122  $\Delta$ *fim*), une souche APEC et son dérivé, pour les tissus aviaires. Ce sont donc ces quatre souches qui ont été marquées au FITC.

Pour chaque souche, 80 mL de culture en bouillon LB préalablement incubée 48 heures à 37 °C sans agitation ont été centrifugés afin de n'en garder qu'un culot de bactéries concentrées. Ont été ajouté au culot 2 mL d'une solution filtrée de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M et de NaCl 0,9 % (p/v) ajustée à un pH de 9,0, contenant 75 µg/mL de FITC. À partir de cette étape, le tube contenant les bactéries et le FITC a du être protégé de la lumière car le marqueur fluorescent y est sensible. La préparation a donc ensuite été vigoureusement agitée afin que le culot bactérien se disperse dans le 2 mL de solution de marquage, puis le tube a été laissé à température pièce durant 30 minutes avec agitations fréquentes afin que le marquage s'effectue efficacement. À la fin de la période de marquage, 20 mL d'une solution de lavage (PBS-Tween20 0,05 % (v/v) filtré) sont

ajoutés aux bactéries. Par la suite, la suspension bactérienne a été centrifugée puis rincée trois fois avec 20 mL de la même solution de lavage. Le dernier culot obtenu a finalement été resuspendu dans 1 mL de tampon PBS, puis aliquoté en portions de 10  $\mu$ L dans des tubes de plastiques de 1,5 mL pour finalement être congelés à -30 °C. Au moins 24 heures après la congélation, un tube doit être décongelé afin d'être soumis à un compte viable. Le contenu du tube a donc été dilué plusieurs fois puis étalé à différentes concentrations sur des géloses LB. Cette étape permet de déterminer la concentration bactérienne post-congélation des tubes et ainsi de mieux ajuster les préparations bactériennes qui serviront dans les tests d'adhérence aux coupes congelées d'organes.

### **2.6.2.3 Tests d'adhérence**

Avant d'effectuer le test d'adhérence, les coupes d'organes sur les lames de verre doivent être fraîchement fixées. Pour ce faire, elles ont été plongées dans une solution de paraformaldéhyde 3,5 % (p/v) à 4 °C pendant 60 minutes. Suite à cette étape de fixation, les lames ont été rincées trois fois avec du tampon PBS. Les bactéries préalablement marquées au FITC ont ensuite été dégelées avant d'être diluées dans du PBS puis mises en contact avec les différents inhibiteurs d'adhérence à tester. Les volumes de suspensions bactériennes, de PBS et d'inhibiteurs ont été déterminés en fonction du compte viable préalablement effectué sur un tube de bactéries de la même série afin d'obtenir une concentration finale de  $10^8$  CFU/mL et d'obtenir des séries de dilutions des inhibiteurs d'adhérence à tester. Des gouttes de différents volumes en fonction du diamètre des organes ont ensuite été déposées directement sur les coupes d'organes. Les lames ont été incubées dans une boîte opaque à 4 °C pour une période de 60 minutes. Afin d'éliminer les bactéries n'ayant pas adhéré aux coupes d'organes, les lames sont finalement lavées deux fois avec du tampon PBS durant cinq minutes avec une faible agitation constante.

### **2.6.2.4 Observation**

Pour faciliter l'observation, les lames ont dûes être fixées au méthanol. Cette étape consiste tout simplement à plonger les lames une à une dans un tube de méthanol non-dilué durant une minute puis de laisser sécher les lames à l'obscurité sur un papier absorbant. Des lamelles ont ensuite été collées aux lames grâce à une colle de montage à

base de toluène Shur/Mount TBS. Afin de bien sceller le contour des lamelles, du vernis à ongle transparent a été appliqué sur tout le périmètre des lamelles et ces dernières ont été laissées à sécher à l'obscurité pendant un minimum de huit heures. Une fois les montages bien secs, les lames ont été observées dans une chambre noire grâce à un microscope à fluorescence Leica à une longueur d'onde de 490 nm. L'observation est effectuée avec un objectif à immersion de 1000X. Les bactéries marquées au FITC apparaissant alors en vert sont dénombrées de façon méthodique sur un nombre déterminé de champs aléatoires en fonction de l'organe observé.

**Chapitre 3.**  
**Résultats**

### 3.1 Création de souches mutantes

Il a été confirmé grâce aux tests d'agglutination de levure ainsi que par PCR que des mutants  $\Delta fim$  ont été obtenus pour les souches UCB34 et ECOR72 grâce à la technique de l'échange allélique à partir du plasmide pDM915. De plus, les mêmes tests ont aussi servi à confirmer l'obtention d'un mutant CFT073 $\Delta fimH$  créé grâce à la méthode de Datsenko et Wanner à partir de l'allèle déjà muté de la souche QT1069 (BW25113 $\Delta fimH$ ). Les mutants ont démontré un phénotype d'absence d'agglutination en présence de levures.

Parmi les mutants potentiels issus des deux techniques, au moins un candidat par souche a démontré des résultats confirmant le succès de la mutation dans les deux tests effectués. Les nouvelles souches QT1516 (ECOR72 $\Delta fim$ ), QT1500 (UCB34 $\Delta fim$ ) et QT1499 (CFT073 $\Delta fimH$ ) sont incapables d'agglutiner une solution de levures 3 % (p/v). De plus, selon les analyses par PCR, ECOR72 $\Delta fim$  et UCB34 $\Delta fim$  n'entraînent aucun produit visible lorsque soumises à une amplification du gène *fimC* et à une migration sur gel, ce qui suggère que l'opéron *fim* est absent de chacune de ces souches. Les souches parentales ECOR72 et UCB34 servant de contrôles positifs ont quant à elles démontrés une amplification du gène *fimC*.

Finalement, lors du test de confirmation par PCR de la souche CFT073 $\Delta fimH$ , des amplicons d'environ 1600 paires de bases a été obtenu. Cette taille correspond à la région *fimH* interrompue récoltée de la souche BW25113 $\Delta fimH$ . De plus, la bande obtenue avec le contrôle CFT073 sauvage était d'environ 1100 paires de bases. Cette différence d'environ 500 paires de bases est attribuable à la perte d'une section d'environ 1000 paires de bases du gène *fimH* et le gain de la cassette de résistance à la kanamycine qui a une taille d'un peu moins de 1500 paires de bases.

### 3.2 Co-infections démontrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation

Afin de déterminer si les fimbriae de type 1 sont d'une importance équivalente pour la virulence de différentes souches, des co-infections dans le modèle d'infection du

tractus urinaire murin ont été effectuées. Les trois souches uropathogènes phylogénétiquement différentes CFT073, ECOR72 et UCB34 ont été testées. Pour chaque souche, un mutant  $\Delta fim$  a été mis en compétition contre un mutant isogénique  $\Delta lac$  ayant un potentiel pathogène équivalent à la souche sauvage. Le fait d'utiliser un mutant  $\Delta lac$  plutôt qu'une souche sauvage facilite la distinction entre les souches mises en compétition lors du dénombrement de colonies sur géloses MacConkey.

Afin de s'assurer que les résultats sont comparables entre eux et que les doses administrées étaient bien balancées au niveau des souches compétitrices, des comptes viables en duplicatas à quatre dilutions différentes ont été effectués avant de procéder avec les infections. Les moyennes et les ratios sont indiqués dans le **Tableau 3.1**. Tel qu'attendu, les quatre inocula comptent tout près de  $10^{11}$  CFU/mL, ce qui signifie que les doses administrées de 20  $\mu$ L contenaient près de  $5 \times 10^9$  bactéries vivantes. De plus, les ratios obtenus indiquent que les proportions entre les souches compétitrices étaient relativement équivalentes.

**Tableau 3.1 Comptes viables et ratios des inocula de départ**

Groupe	Inoculum total CFU/mL	Ratio $\frac{\Delta fim \text{ ou } \Delta fimH}{\Delta lac}$
CFT073	$1,46 \times 10^{11}$	1,09
UCB34	$9,13 \times 10^{10}$	0,72
ECOR72	$1,69 \times 10^{11}$	1,23
ECOR72 agité 18 h	$8,56 \times 10^{10}$	0,90

En général, le travail avec les rongeurs s'est bien déroulé. Malheureusement, une souris du groupe d'infection à UCB34 a été perdue avant la fin de l'incubation prévue. À la suite de la première anesthésie et de l'inoculation transurétrale, tel qu'à l'habitude, cette souris a été replacée dans sa cage en attendant son réveil, ce qui n'est jamais arrivé. On croit qu'elle aurait subi des complications reliées à l'anesthésie. Il est possible qu'un organe ait été touché lors de l'injection péritonéale du mélange anesthésiant.



Au cours des nécropsies ayant lieu 48 heures post-infection, avant de prélever un organe à une souris, un écouvillon stérile a été passé sur la surface et l'environnement de l'organe en question. Ces écouvillons ont par la suite été frottés sur des géloses MacConkey afin de déterminer si la cavité abdominale de la souris était contaminée. Dans le cas des groupes infectés par UCB34 et ECOR72, aucune contamination abdominale n'a été détectée. Chez les souris infectées par CFT073, des contaminations légères à moyennes ont été retrouvées chez sept des 13 souris infectées. Dans tous les cas, les bactéries retrouvées ont formé des colonies blanches d'apparence consistante aux colonies normalement formées par *E. coli*, ce qui suggère qu'il s'agit de la souche CFT073 $\Delta lac$  présente dans l'inoculum administré aux souris. Le tableau 3.2 résume bien l'incidence des contaminations abdominales rencontrées.

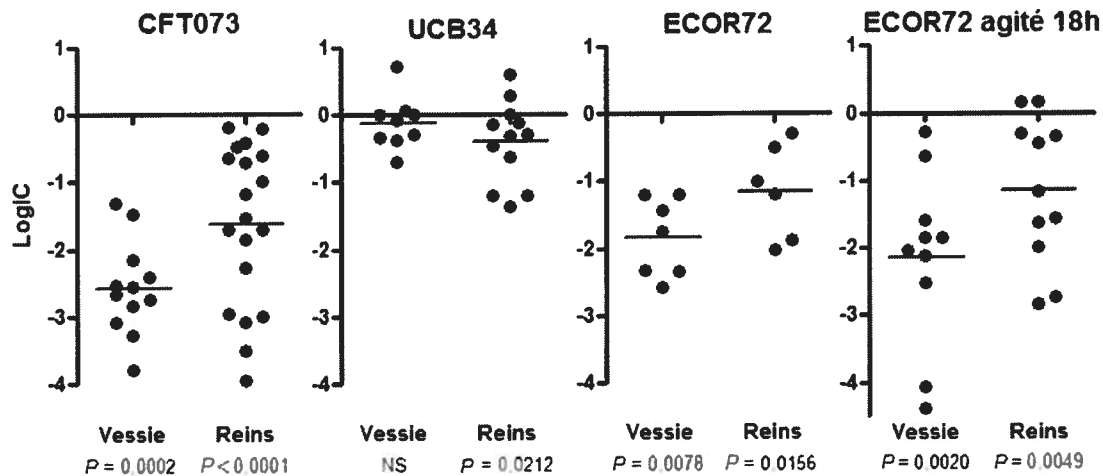
**Tableau 3.2 Contamination des cavités péritonéales de souris**

Numéro des souris	Organe contaminé	UFC détectées par écouvillonnage
1	Vessie	132
4, 6 et 7	Rein droit	1
8	Rein droit	56
9	Rein droit et gauche	19 et 4
13	Rein droit et gauche	2 et 1

Les résultats des comptes viables issus du broyage des organes infectés ont été compilés sous forme d'un index de compétition (IC) qui représente le ratio d'UFC par gramme d'organe des souches sans fimbriae fonctionnel par rapport à leurs souches compétitrices  $\Delta lac$ . Ces résultats ont ensuite été représentés graphiquement grâce aux logarithmes des IC. Un LogIC supérieur à zéro signifierait que la souche  $\Delta fim$  ou  $\Delta fimH$  a un avantage par rapport à la souche  $\Delta lac$ . À l'inverse, un LogIC négatif démontre que le pouvoir pathogène de la souche  $\Delta fim$  ou  $\Delta fimH$  est atténué.

Comme on peut l'observer à la **Figure 3.1**, les moyennes des logarithmes des index de compétition sont toutes négatives. Dans le cas de CFT073 et de ECOR72, les mutants  $\Delta fimH$  et  $\Delta fim$  sont significativement atténués par rapports à leurs souches virulentes compétitives respectives autant dans la vessie que dans les reins selon un test statistique de Wilcoxon. Dans les deux cas on peut aussi remarquer que cette atténuation est plus marquée dans la vessie que dans les reins. Dans le cas de UCB34, on constate une faible atténuation tout de même significative dans les reins seulement. Dans la vessie, la souche UCB34 $\Delta fim$  n'est pas du tout atténuée. C'est donc dans la souche CFT073 que l'atténuation semble la plus marquée.

De plus, on peut constater que les profils de résultats pour les infections par la souche ECOR72 cultivée dans deux conditions différentes sont très similaires. Tout comme pour les autres souches, un groupe de ECOR72 a été cultivé de façon statique durant 48 h. L'autre groupe a été cultivé durant différence significative n'a donc été trouvée en comparant les données pour le même organe cultivé dans les deux conditions de croissance.



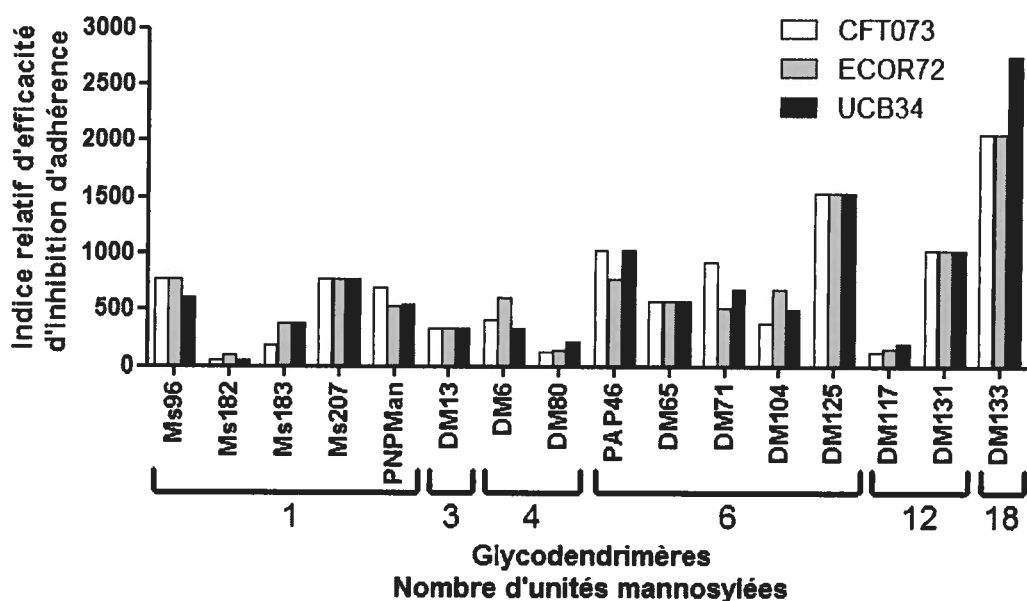
**Figure 3.1** Co-infections démontrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation.

Résultats comparatifs de la colonisation des souris CBA/J par des inocula composés de souches  $\Delta fimH$  ou  $\Delta fim$  en compétition contre des souches virulentes isogènes  $\Delta lac$ . Les données présentées sont les logarithmes des index de compétition, ces index étant les résultats du ratio de la charge bactérienne en CFU par gramme d'organe des souches déficientes pour les fimbriae de type 1 par rapport à celle des souches isogènes  $\Delta lac$ . Les statistiques ont été déterminées grâce à un test de Wilcoxon.

### 3.3 Agglutination de levures en microplaques

Les tests d'agglutination de levures ont servi à évaluer l'efficacité des inhibiteurs d'adhérence d'une façon relativement simple et rapide. La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'agglutination a été déterminée pour chaque inhibiteur en présence de chaque souche. Ces données ont ensuite été normalisées par rapport à la CMI d'agglutination du méthyl-mannose obtenue au cours de la même expérience. Un indice d'efficacité d'inhibition d'adhérence a donc été obtenu en calculant le ratio de CMI d'agglutination de l'inhibiteur en question par rapport à celle du méthyl-mannose. Ces résultats sont d'ailleurs présentés à la **Figure 3.2**.

Tel qu'attendu, les molécules ne comportant qu'une seule unité mannosylée sont en général moins efficaces que celles qui en ont plusieurs. De plus, la molécule la plus efficace est celle qui possède le plus grand nombre d'unités mannosylées, il s'agit de DM133 avec 18 unités. Parmi les plus efficaces, on retrouve PAP46 ainsi que trois des quatre molécules du groupe des cyclotriphosphazènes, soit DM125, DM131 et DM133. À l'inverse, quelques glycodendrimères se sont avérés être beaucoup moins efficaces que



**Figure 3.2** Inhibition d'agglutination de levures par des molécules mannosylées. Les indices relatifs d'inhibition d'adhérence ici présentés sont le résultat d'une normalisation de la concentration minimale inhibitrice d'agglutination des différentes molécules mannosylées en fonction de celle du contrôle, le méthyl-mannose.

les autres molécules de même nombre d'unités mannosylées telles que DM117 et DM80.

Malgré que les molécules les plus efficaces ont été celles qui possèdent le plus grands nombre d'unités mannosylées, aucune d'entre elles ne démontrent une efficacité par unité mannosylée supérieure à celle de la majorité des monomères testés. En effet, si l'on multipliait l'efficacité des meilleurs monomères par 18, on obtiendrait un chiffre de quatre à cinq fois plus élevé que l'efficacité du glycodendrimère qui possède 18 unités mannosylées. De plus la majorité des pentaérythritols qui possèdent de trois à six unités mannosylées ont des indices d'efficacité comparables à celles des meilleures monomères.

Les tests effectués en parallèle sans inhibiteur d'adhérence avec les souches contrôles mutantes CFT073 $\Delta$ fimH, ECOR72 $\Delta$ fim et UCB34 $\Delta$ fim n'ont démontré aucune agglutination. Cela confirme donc que les fimbriae de type I sont bel est bien responsables du phénomène d'agglutination de levures.

Malheureusement, lors de cette expérience, des triplicatas n'ont pu être réalisés car les inhibiteurs d'adhérence créés par l'équipe de René Roy étaient disponibles en quantités limités. La répétition des expériences nous aurait empêchés d'effectuer d'autres types de tests avec les mêmes molécules. Cela dit, les inhibiteurs d'adhérence ont réagit de façons similaires avec les trois souches, ce qui démontre une reproductibilité.

## **3.4 Tests d'adhérence**

### **3.4.1 Cellules T24 et HeLa en culture**

Les tests d'adhérence aux cellules cancéreuses de vessie humaine T24 en cultures ont été inconcluants. Bien que beaucoup d'efforts aient été investis dans de multiples tentatives de mise au point décrites à la section 2.6.1, les résultats obtenus ont tous été incohérents avec la théorie en plus d'être irreproductibles. Suite à cet échec de mise au point, la lignée T24 a été remplacée par la lignée de cellules cervicales humaines HeLa. Malheureusement, des résultats aussi hétérogènes et incohérents ont été obtenus avec cette seconde lignée. Puisque cette technique aurait nécessité encore plus de mise au point, les tests d'adhérence sur des cellules en culture ont été abandonnés pour faire place à des tests d'adhérence sur des coupes congelées d'organes de modèles animaux.

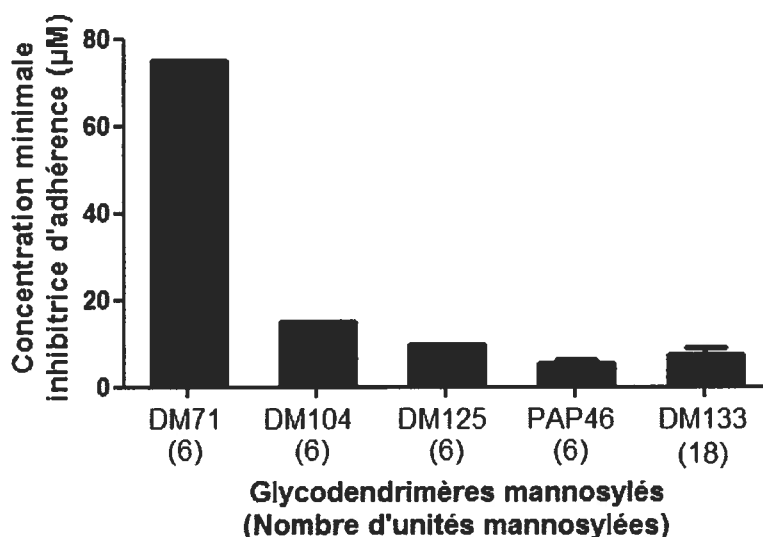
### 3.4.2 Coupes congelées d'organes

Pour tous les tests d'adhérence sur des coupes congelées d'organe, différentes concentrations des inhibiteurs d'adhérence ont été testées. La concentration minimale inhibitrice (CMI) d'adhérence a été considérée comme étant la plus faible concentration capable de faire diminuer l'adhérence à moins de 30 % de ce qu'elle est en absence de molécules inhibitrices. À cet effet, les molécules les plus efficaces ont des valeurs faibles et les molécules les moins efficaces ont une CMI d'adhérence élevée.

#### 3.4.2.1 Vessies de souris

Les tests d'adhérences sur des vessies de souris dont les résultats sont présentés à la **Figure 3.3** ont permis de déterminer l'efficacité de certains glycodendrimères à inhiber l'adhérence par CFT073 directement sur des vessies. Malheureusement, la petite taille de cet organe a permis d'effectuer un nombre assez limité de coupes congelées par organes. Étant limités par le nombre de coupes congelées de vessies, le maximum de tests ont été effectués en triplicatas sur les vessies en notre possession. Par contre, aucune autre vessie n'a été récoltée pour effectuer plus de tests étant donné le faible rendement de coupes congelées par animal.

En concordance avec les résultats des tests d'agglutination de levures à la section 3.3, les quatre inhibiteurs les plus efficaces ont une fois de plus donné d'excellents résultats. Un résultat un peu plus surprenant a été obtenu avec le glycodendrimère DM71 qui, sans ressortir du lot, avait quand même obtenu une efficacité qui se rapprochait des autres au niveau des tests d'agglutination de levures. Les résultats présentés ici démontrent pourtant une capacité réduite à inhiber l'adhérence aux vessies de souris. La souche contrôle CFT073 $\Delta$ *fimH* a aussi été testée en parallèle en absence de tout inhibiteur et une adhérence inférieure à 30 % a été observée.

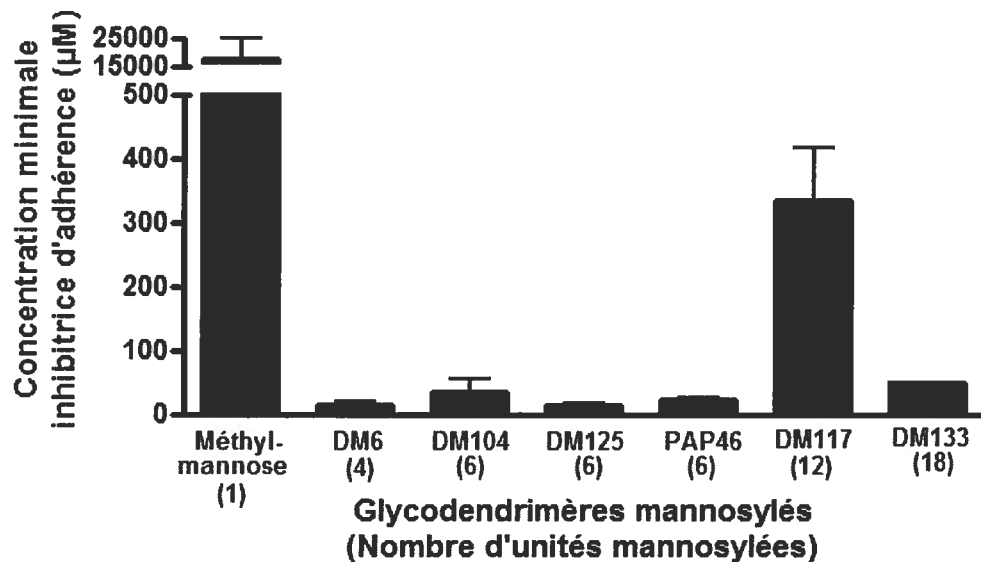


**Figure 3.3** Tests d'adhérence de CFT073 sur coupes congelées de vessies murines. Les données ici présentées représentent les concentrations minimales nécessaires de cinq glycodendrimères mannosylés pour inhiber 30 % de l'adhérence rencontrée par CFT073 sur des coupes congelées de vessies de souris et ce en absence d'inhibiteur.

### 3.4.2.2 Trachées de poulets

Les résultats présentés à la **Figure 3.4** sont les données récoltées suite aux tests d'adhérence à des trachées de poulets par la souche  $\chi 7122$ . Les concentrations minimales inhibitrices d'adhérence ont été calculées de la même façon que pour les vessies, c'est-à-dire qu'il s'agit de la concentration la plus faible capable d'abaisser le niveau d'adhérence en dessous de 30 % du niveau enregistré en absence d'inhibiteur.

Encore une fois, les molécules ayant bien performé dans les tests précédents ont été très efficaces. Tout comme dans les tests d'agglutination de levures, la molécule DM117 a conféré une inhibition d'adhérence faible en comparaison avec les autres glycodendrimères. À titre comparatif, le méthyl-mannose a aussi été testé, n'offrant une inhibition d'adhérence qu'à des concentrations jusqu'à 1000 fois supérieures à celles nécessaires pour les glycodendrimères. La souche contrôle  $\chi 7122\Delta fim$  a aussi été testée en parallèle en absence d'inhibiteur et a obtenu une adhérence inférieure à 30 %.



**Figure 3.4** Tests d'adhérence de  $\chi7122$  sur coupes congelées de trachées aviaires. Les données ici présentées représentent les concentrations minimales de six glycodendrimères nécessaires pour inhiber 30 % de l'adhérence par  $\chi7122$  rencontrée en absence d'inhibiteur. On peut aussi y voir la CMI d'adhérence du méthyl-mannose à titre comparatif.

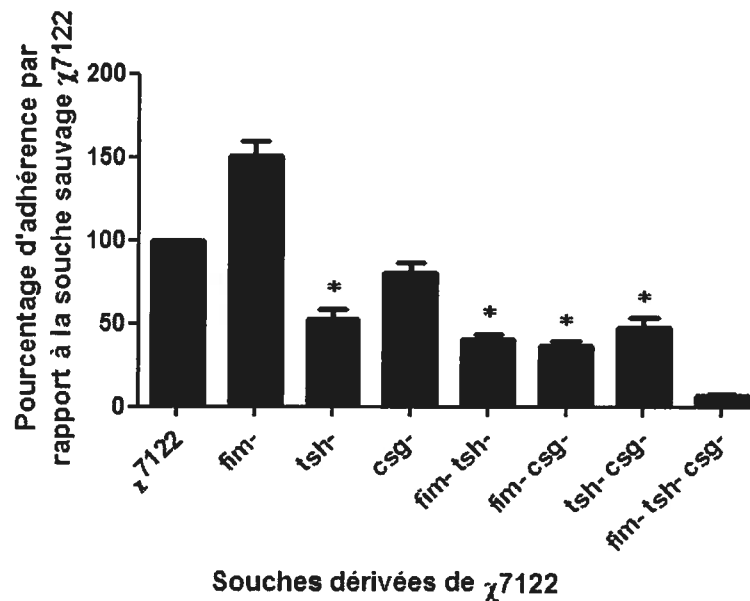
### 3.4.2.3 Poumons de poulets

En effectuant des tests de mise au point avec les poumons de poulet, les profils d'adhérences observés ont été très surprenants. À chaque essais expérimentaux, le mutant  $\chi7122\Delta fim$  démontrait un niveau d'adhérence supérieur à celui de la souche sauvage. De plus, le profil d'adhérence de la souche sauvage et de son mutant n'était pas de tout affecté par d'importantes concentration de méthyl-mannose (données non présentées). Ces données suggérant que le fimbriae de type I n'effectuait pas d'adhérence dans les poumons, les tests d'inhibition d'adhérence n'ont pu être effectués sur des coupes de poumons.

Malgré que ça ne fasse parti des objectifs du projet, ces données ont semblée être intéressantes par rapport à la recherche sur l'établissement des infections respiratoires aviaires. Afin de trouver quels adhésines sont réellement responsables d'une adhérence dans les poumons, d'autres tests d'adhérence sur les coupes congelées de poumons ont été menés avec différents dérivés de  $\chi7122$  mutants pour toutes les combinaisons

possibles des gènes *fim*, *tsh*, et *csg* codant respectivement pour les fimbriae de type 1, l'adhésine afimbriaire de type autotransporteur Tsh et les fimbriae curli.

Les résultats présentés à la **Figure 3.5** démontrent que tous les mutants déficients pour une ou les deux adhésines Tsh et curli permettent d'abaisser le niveau d'adhérence en dessous du niveau de la souche sauvage, en présence comme en absence de fimbriae de type 1. Les triple mutant déficient pour les trois adhésines est celui qui permet le plus faible niveau d'adhérence.



**Figure 3.5** Tests d'adhérence sur coupes congelées de poumons aviaires.

Ces données représentent les pourcentages d'adhérences de sept mutants dérivés de la souche  $\chi 7122$  en fonction du niveau d'adhérence de leur souche mère. Les astérisques (\*) signifient que ces résultats ne sont significativement pas différents entre eux. Les bandes sans astérisques sont donc significativement différentes de toutes les autres. De plus, tous les mutants sont significativement différents du 100 % représenté par la souche  $\chi 7122$  sauvage.

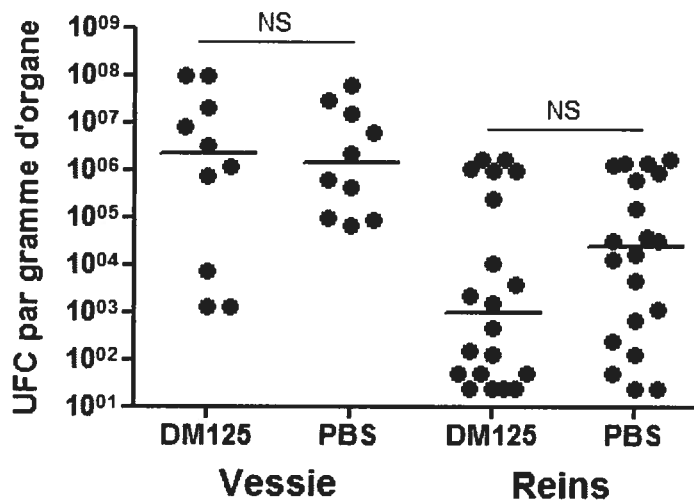
### 3.5 Mono-infections avec un inhibiteur d'adhérence

Des infections de souris avec la souche CFT073 en présence et en absence de l'inhibiteur d'adhérence DM125 ont été effectuées afin d'évaluer s'il était efficace *in vivo*. Le compte viable du culot bactérien de départ, avant d'être mélangé à l'inhibiteur ou au PBS, a donné une moyenne de  $4,13 \times 10^{11}$  UFC/mL. En tenant compte de la dilution dans l'inhibiteur ou le PBS ainsi que du volume injecté, on a déterminé



qu'environ  $8,25 \times 10^9$  UFC ont été administré par souris accompagné d'une concentration de DM125 de 5 mM pour le groupe concerné.

Les résultats présentés à la **Figure 3.6** obtenus grâce au broyage des organes ont ici été rapportés directement en UFC par gramme d'organe. Tel qu'attendu, la charge bactérienne était supérieure dans la vessie que dans les reins. Cela n'est pas surprenant puisque la vessie est un passage obligatoire pour accéder aux reins. Un test statistique de Mann-Whitney sur les résultats obtenus n'a démontré aucune différence significative entre le groupe inoculé avec l'inhibiteur DM125 et le groupe témoin (PBS).



**Figure 3.6** Infections de souris avec CFT073 en présence et en absence de DM125. Chaque cercle plein représentant un organe, les résultats sont présentés en UFC par gramme d'organe sur une échelle logarithmique. Les statistiques ont été obtenues grâce à un test de Mann-Whitney.

**Chapitre 4.**  
**Discussion**

## 4.1 Co-infections démontrant le rôle des fimbriae de type 1 pour la colonisation

Des co-infections dans un modèle d'ITU murin ont été effectuées afin de comparer l'impact sur la virulence de la perte de fonctionnalité des fimbriae de type 1 chez différentes souches UPEC. Les résultats obtenus nous ont permis de découvrir que la perte des fimbriae de type 1 n'affectait pas la virulence de la souche UCB34 dans la vessie et l'affecte légèrement dans les reins. À l'inverse, les souches CFT073 $\Delta$ *fimH* et ECOR72 $\Delta$ *fim* sont très atténuées dans tous les organes du tractus urinaire. Dans ces deux cas, tel qu'attendu, la virulence était plus affectée dans les vessies que dans les reins. Cela est fort probablement causé par la présence abondante dans la vessie d'urolapline Ia, un récepteur naturel de FimH. De plus, il est connu que ce sont surtout les fimbriae P qui sont utiles dans les tissus rénaux.

Il est intéressant de noter que la souche UCB34 est un pauvre colonisateur de la vessie (Leveille *et al.*, 2006). De plus, la production de fimbriae de type 1 par cette souche est plutôt faible par rapport à d'autres souches testées dans les expériences d'agglutination de levures. Ces résultats suggèrent que pour la souche UCB34, l'inactivation des fimbriae de type 1 n'a pas autant d'impact sur la colonisation que dans le cas des autres souches UPEC. Il est probable que d'autres adhésines comme les fimbriae P ou l'adhésine Iha pourraient contribuer à la colonisation du tractus urinaire par la souche UCB34 (de Man *et al.*, 1988; Wullt *et al.*, 2001).

Afin de vérifier la stérilité de la cavité abdominale des souris à la fin de la période d'infection, des écouvillons stériles ont été frottés sur l'environnement de chacun des organes immédiatement avant qu'ils soient retirés. Ces écouvillons ont ensuite été passés sur des géloses MacConkey. Des colonies ont été retrouvées chez ces géloses uniquement dans le groupe de souris infecté par la souche CFT073. De plus, toutes les colonies retrouvées étaient blanches, signifiant qu'il ne s'agissait pas de la souche CFT073 $\Delta$ *fimH*. Il est donc fort probable que la souche CFT073 $\Delta$ *lac*, beaucoup plus virulente et persistante, soit responsable de cette contamination. Une seule souris a eu l'environnement de la vessie contaminé par plus de 150 bactéries. Il est possible que cela

soit dû à une petite brèche dans l'organe. Cette coupure a pu être causée par l'insertion du cathéter lors de l'inoculation initiale. Une blessure importante telle qu'une perforation complète de la vessie, aurait par contre entraîné des séquelles beaucoup plus importantes. Il est aussi possible que l'organe ait été percé par les pinces de métal utilisées dans les manipulations de l'organe au même moment où l'écouvillon a été passé. Les plus fréquentes mais faibles contaminations des reins droits sont probablement dues au fait que lors d'une nécropsie, le rein gauche est retiré juste avant le droit et cette procédure entraîne souvent des saignements pouvant contenir des bactéries dans la cavité péritonéale.

Les deux groupes d'infections impliquant la souche ECOR72 ont permis de déterminer que les conditions de croissance favorisant ou réprimant les fimbriae de type 1 n'avaient aucune incidence sur le résultat de la procédure. Cela suggère que dès que les bactéries sont placées dans des conditions *in vivo*, une pléiade de facteurs environnementaux tels que la température, le pH et l'osmolarité viennent rapidement influencer la régulation des fimbriae de type 1.

Les résultats des co-infections de souris ont aussi permis de choisir la souche CFT073 comme meilleur modèle pour les tests d'adhérence subséquents étant donné que les fimbriae de type 1 semblent avoir une importance majeure dans sa virulence par rapport à celles des autres souches.

## **4.2 Agglutinations de levures en microplaques**

Suite aux tests d'agglutination de levure, on peut identifier quels glycodendrimères mannosylés semblent être les plus efficaces. Plusieurs des molécules inhibent l'agglutination de levures au moins 1000 fois plus efficacement que le méthylmannose. Le DM133, glycodendrimère à 18 unités mannosylées, est plus de 2000 fois plus efficace que l'inhibiteur de référence. Lorsque l'on étudie l'efficacité par unité, on réalise que ce sont des monomères qui ont les taux les plus élevés. On note tout de même que plusieurs glycodendrimères à six unités ont une efficacité par unité supérieure aux autres glycodendrimères à unités multiples. Malgré que nous nous attendions à ce que l'augmentation du nombre d'unités mannosylées ait un effet exponentiel sur l'inhibition de l'adhérence, on observe tout de même un bon potentiel pour plusieurs molécules.

Aucune tendance claire en fonction du nombre d'unités mannosylées ainsi que de la classe du cœur du glycodendrimère n'a été observée. Cela porte à croire que ce ne sont pas les seuls facteurs déterminants dans l'efficacité d'une molécule. La composition des chaînes reliant les unités mannosylées aux différents cœurs semble être un facteur important. En effet, les seules molécules à arborer des atomes de soufre sont le DM117 et les monomères Ms182 et Ms183 et sont par le fait même les molécules les plus faibles de leurs catégories respectives.

Malgré que les quantités limitées de molécules à tester aient empêché d'effectuer les tests en triplicata, chaque inhibiteur a tout de même été testé sur trois souches différentes. Cela a permis de démontrer que les inhibiteurs agissent de façon similaire sur les différentes souches lorsque ces dernières sont cultivées de manière à favoriser l'expression de fimbriae.

## **4.3 Tests d'adhérence**

### **4.3.1 Cellules T24 et HeLa en culture**

Après plusieurs tentatives infructueuses de mise au point, la technique de tests d'adhérence à des cellules en culture a été abandonnée. Selon la littérature, certains groupes ont déjà réussi à observer une adhérence satisfaisante, reproductible et concordante avec les résultats attendus avec les cellules T24 et certaines souches UPEC (Di Martino *et al.*, 2006; Meiland *et al.*, 2004). Par contre, il a récemment été rapporté dans la littérature qu'il était possible pour certaines souches UPEC d'adhérer et d'envahir les cellules T24 en présence de mannose et ce, sans les fimbriae P et S et l'adhésine afimbriaire Afa. Ces données suggèrent donc que des facteurs bactériens à ce jour inconnus permettent d'adhérer à la lignée cellulaire T24 (Miyazaki *et al.*, 2002). Aussi, plusieurs articles ont été publiés au sujet de la modification de certains récepteurs chez les cellules T24 par rapports aux cellules épithéliales de vessie non cancéreuses (Tully *et al.*, 2009). Des modifications au niveau des récepteurs de cellules T24 en présence d'UPEC ont aussi été rapportées (Save *et al.*, 2009). Rien n'a encore été publié spécifiquement à propos des uroplakines Ia, récepteur principal des fimbriae de type I, mais l'intégrité et la stabilité de ce récepteur n'a pas non plus été confirmée.

En bref, il est possible que le problème de mise au point soit à différents niveaux du test d'adhérence. D'abord, puisque les cellules T24 proviennent d'une tumeur cancéreuse, qu'elles ont été grandement manipulées et qu'elles ont subi de multiples passages, il est possible que des mutations soient survenues au niveau de certains récepteurs, ce qui créerait une interférence dans l'adhérence aux bactéries. Si tel est le cas, il est possible que les récepteurs de fimbriae de type 1 soient absents ou dysfonctionnels ou bien que d'autres récepteurs aient acquis une nouvelle capacité d'adhérence avec *E. coli* au niveau d'autres molécules de surface bactériennes. Il est aussi possible que le problème soit au niveau du choix de souches utilisées. Étant donnée la présence de plusieurs différentes adhésines chez la majorité des souches d'*E. coli* K-12 et des souches uropathogènes, il est possible que d'autres molécules capables d'adhérer aux cellules T24 aient masqué l'effet de l'adhérence par les fimbriae de type 1. La troisième hypothèse est que, lors des tentatives de mise au point de la technique, les paramètres idéaux pour ces tests d'adhérence n'ont malheureusement pas été atteints. Le nombre de variables étant important, il n'a évidemment pas été possible d'essayer toutes les combinaisons possibles de conditions.

L'expérience des tests d'adhérence a par contre été essayée sur une autre lignée cellulaire. Il s'agit de la lignée HeLa dont les cellules proviennent d'un cancer cervical. Cette lignée n'a malheureusement pas mieux répondu que les cellules T24. Le col de l'utérus n'étant pas un tissu reconnu comme hôte pour *E. coli*, il est possible que les fimbriae de type 1 des UPEC n'y adhèrent pas naturellement de façon efficace. Il est par contre fort probable que le problème soit au niveau de certains paramètres d'expérimentation qui n'ont pas été essayés. Les tests en culture cellulaire ont donc été un échec et aucun résultat n'en est ressorti.

## **4.3.2 Coupes congelées d'organes**

### **4.3.2.1 Vessies de souris et trachées de poulets**

Les tests d'adhérences sur les tissus murins et aviaires ont permis d'obtenir une mesure de l'efficacité des glycodendrimères dans un contexte beaucoup plus près de la réalité qu'avec les levures de boulangerie. Des concentrations plus faibles au niveau des vessies murines ont été nécessaires pour obtenir une inhibition d'adhérence efficace par

rapport aux trachées de poulet. Cela n'est pas surprenant puisque l'adhérence par les fimbriae de type I est reconnue pour être une étape cruciale dans les ITU alors que dans le cas de la colibacillose aviaire, son implication tout de même importante n'est pas aussi claire et agit généralement en collaboration avec d'autres adhésines.

Tel qu'attendu, les glycodendrimères mannosylés ayant obtenu de bons résultats lors des tests d'agglutination de levures ont été constants et ont inhibé l'adhérence aux coupes d'organes à de faibles concentrations. De plus, le glycodendrimère mannosylé ayant obtenu le pire résultat, c'est-à-dire DM117, faisait aussi partie des inhibiteurs d'agglutination de levures les moins efficaces malgré ses 12 unités mannosylées. De plus, la différence entre les résultats obtenus avec le méthyl-mannose et ceux des glycodendrimères démontre clairement que ces molécules, même les moins efficaces, ont une affinité grandement améliorée pour les récepteurs des fimbriae de type I.

Il est clair que les inhibiteurs DM133, DM125 et PAP46 ont un très fort potentiel d'inhibition de l'adhérence. Malheureusement, les quantités de la majorité des glycodendrimères mannosylés étant très limitées, il n'a pas été possible d'obtenir des résultats avec les autres. Malgré tout, les résultats de DM6 et DM104 démontrent aussi un potentiel d'inhibition de l'adhérence laissant croire qu'il est possible que certains inhibiteurs n'ayant pas été testés sur des coupes congelées d'organes auraient pu tout aussi bien performés. On peut par contre affirmer que les glycodendrimères DM71 et DM117 sont significativement moins efficaces que les autres molécules testées et qu'il y a peu de chances qu'elles soient considérées comme agent thérapeutiques potentiels.

#### **4.3.2.2 Poumons de poulet**

Malgré qu'ils n'aient aucun intérêt par rapports aux inhibiteurs d'adhérence mannosylés, les résultats obtenus lors des tests d'adhérence sur les poumons de poulets ont révélés d'importantes informations sur la stratégie de pathogénèse des APEC dans le tractus respiratoire des poulets.

Ces données ont permis de déterminer que le fimbriae de type I avait peu d'impact sur l'adhérence par la souche  $\chi$ 7122 à des tissus pulmonaires aviaires. De plus, un rôle dans cette adhérence a été attribué à Tsh, une adhésine afimbriaire de type autotransporteur et aux curli, des fimbriae présents chez les APEC. Puisque l'absence de

fimbriae de type 1 augmente l'adhérence, il est possible qu'un phénomène de « cross-talk » se produisent entre ces adhésines, favorisant ainsi l'augmentation de la production des autres fimbriae en absence des fimbriae de type 1. En effet, en absence de Tsh et des curli, la perte des fimbriae de type 1 entraîne une diminution de l'adhérence plutôt qu'une augmentation tel qu'observé en présence des deux adhésines. Cela suggère donc que l'augmentation d'adhérence causée par la mutation simple de *fim* est probablement due à une augmentation de la production de Tsh et/ou de curli. Il est aussi possible que la perte de structures fimbriaires de grandes tailles permettrait une meilleure exposition d'autres adhésines qui sont physiquement plus petites et localisé plus près de la surface bactérienne et ainsi augmenter leur efficacité d'adhérence. De plus, les données suggèrent que l'implication de Tsh est légèrement plus importante que celle des curli puisqu'une mutation simple dans *tsh* diminue l'adhérence au même niveau que celle obtenue par les doubles mutants  $\chi 7122\Delta fim\Delta tsh$ ,  $\chi 7122\Delta fim\Delta csg$ , et  $\chi 7122\Delta tsh\Delta csg$ .

#### **4.4 Mono-infections avec un inhibiteur d'adhérence**

Des infections dans un modèle d'ITU murin ont été effectuées avec la souche CFT073 en présence et en absence de 5 mM de l'inhibiteur d'adhérence DM125. Malheureusement, les résultats ont été inconcluants puisque l'inhibiteur n'a pas réussi à empêcher ni à réduire le degré d'infection sur une période de 24 h. Il est très fort probable que la concentration de DM125 utilisée n'était pas suffisante pour inhiber l'adhérence d'un tel inoculum. Plusieurs paramètres expérimentaux devront être modifiés et essayés avant de connaître les conditions idéales pour faire ressortir le pouvoir thérapeutiques des glycodendrimères mannosylés. La voie d'administration de l'inhibiteur d'adhérence ainsi que la possibilité d'en administrer plusieurs doses devront être repensés et étudiés.



## Conclusions

Grâce aux différents mutants développés, aux infections de souris et surtout grâce aux tests d'agglutination de levures et d'adhérence à des coupes d'organes congelées en présence d'inhibiteurs d'adhérence, ce projet a permis d'identifier certains glycodendrimères mannosylés hautement efficaces pour l'inhibition de l'adhérence par le fimbriae de type 1.

Les mutants ECOR72 $\Delta$ *fim* et UCB34 $\Delta$ *fim* produits grâce à des échanges alléliques ainsi que le mutant CFT073 $\Delta$ *fimH* obtenu par la méthode de Datsenko et Wanner ont tous été très utiles et indispensables en tant que contrôles négatifs d'agglutination ou d'adhérence. Ils ont de plus servis au cours des co-infections de souris qui ont permis de déterminer que les fimbriae de type 1 n'avaient pas un rôle équivalent dans la pathogénèse de tous les UPEC. Ces infections ont aussi fait ressortir CFT073 comme étant la souche, parmi les trois testées, chez laquelle les fimbriae de type 1 ont le plus grand rôle. Cette souche a donc été choisie comme modèle pour les tests d'adhérence aux coupes congelées de vessies et aussi comme souche infectieuse dans le cadre de la tentative d'inhibition d'adhérence *in vivo* par le glycodendrimère DM125.

Ce sont d'abord les tests d'agglutination de levures qui ont permis de rapidement identifier les glycodendrimères mannosylés les plus forts, ainsi que les plus faibles. Avec des efficacités d'adhérence de 500 à 2000 fois meilleures que le méthyl-mannose, PAP46, DM125, DM131 et DM133 se sont vraiment démarqués par rapport aux autres. Les inhibiteurs Ms182, DM80 et DM117 ont aussi été mis en évidence mais ceux-ci, pour leur efficacité particulièrement faible. Les autres molécules ayant des efficacités moyennes ont toutes quand même un bon potentiel d'inhibiteur qui pourra être vérifié par des tests d'adhérence.

Grâce aux tests d'adhérence sur des coupes congelées d'organes murins et aviaires, la grande efficacité des molécules PAP46, DM125 et DM133 a été confirmée. De plus, certaines molécules comme DM6 et DM104 ont aussi démontré une efficacité considérable lorsqu'elles se retrouvaient dans un modèle d'adhérence à des tissus

animaux. Le faible potentiel de DM117 et DM71 a aussi été confirmé. En effet, ces deux glycodendrimères ont obtenus des résultats plutôt faibles au cours des tests d'adhérence aux coupes congelées d'organes.

En voulant évaluer le potentiel d'inhibition d'adhérence des glycodendrimères sur des coupes congelées de poumons, de nouvelles informations sur l'adhérence des APEC aux tissus pulmonaires ont été découvertes. Croyant que le fimbriae de type 1 jouait un rôle important dans l'adhérence aux poumons, il fût une surprise de découvrir que ce sont aussi les curli et l'adhésine afimbriaire de type autotransporteur Tsh qui contribuent à l'adhérence dans le tractus respiratoire aviaire.

On a voulu confirmer la capacité d'adhérence de DM125 dans un modèle d'infections de souris *in vivo* car ce modèle est beaucoup plus représentatif de la réalité que les levures ou les coupes congelées d'organes. Cette démonstration a échoué puisque DM25 à 5 mM n'a eu aucun impact sur la charge bactérienne après 24h. Des durées d'infection, des concentrations différentes et des doses d'inhibiteurs supplémentaires pourraient être considérées afin d'améliorer ce protocole. Ces changements de paramètres pourraient peut-être permettre l'observation *in vivo* de l'effet des glycodendrimère mannosylé sur l'adhérence.

L'objectif de cette étude était d'effectuer l'évaluation de l'efficacité de différents glycodendrimères mannosylés comme inhibiteur de l'adhérence par les fimbriae de type 1 des ExPEC. L'objectif a été rempli dans la mesure où les glycodendrimères les plus efficaces ont été identifié et confirmés par plusieurs méthodes. De plus, certaines de ces molécules ont aussi pu être identifiées comme inhibiteurs faibles et ainsi permettre aux chimistes de comprendre quelles structures sont efficaces et lesquelles le sont moins. En espérant que la recherche sur les glycodendrimères mannosylés se poursuivra et permettra un jour de développer, en alternative aux antibiotiques, des traitements préventifs ou curatifs contre les infections par les ExPEC comme les ITU et la colibacillose aviaire.

## Références

- Abraham, J. M., Freitag, C. S., Clements, J. R. et Eisenstein, B. I. (1985).** An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5724-5727.
- Abraham, S. N., Sun, D., Dale, J. B. et Beachey, E. H. (1988).** Conservation of the D-mannose-adhesion protein among type 1 fimbriated members of the family Enterobacteriaceae. *Nature* **336**, 682-684.
- Achtman, M., Kennedy, N. et Skurray, R. (1977).** Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: role of traT protein in surface exclusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**, 5104-5108.
- Adiciptaningrum, A. M., Blomfield, I. C. et Tans, S. J. (2009).** Direct observation of type 1 fimbrial switching. *EMBO Rep* **10**, 527-532.
- Aguero, M. E., Aron, L., DeLuca, A. G., Timmis, K. N. et Cabello, F. C. (1984).** A plasmid-encoded outer membrane protein, TraT, enhances resistance of *Escherichia coli* to phagocytosis. *Infect Immun* **46**, 740-746.
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J. et Hultgren, S. J. (2003).** Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science* **301**, 105-107.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K. et Rodriguez-Quinones, F. (2003).** Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**, 215-237.
- Aronson, M., Medalia, O., Schori, L., Mirelman, D., Sharon, N. et Ofek, I. (1979).** Prevention of colonization of the urinary tract of mice with *Escherichia coli* by blocking of bacterial adherence with methyl alpha-D-mannopyranoside. *J Infect Dis* **139**, 329-332.
- Aroutcheva, A., Gariti, D., Simon, M., Shott, S., Faro, J., Simoes, J. A., Gurguis, A. et Faro, S. (2001).** Defense factors of vaginal lactobacilli. *Am J Obstet Gynecol* **185**, 375-379.
- Arthur, M., Arbeit, R. D., Kim, C., Beltran, P., Crowe, H., Steinbach, S., Campanelli, C., Wilson, R. A., Selander, R. K. et Goldstein, R. (1990).** Restriction fragment length polymorphisms among uropathogenic *Escherichia coli* isolates: pap-related sequences compared with *rrn* operons. *Infect Immun* **58**, 471-479.
- Austin, J. W., Sanders, G., Kay, W. W. et Collinson, S. K. (1998).** Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **162**, 295-301.

- Autar, R., Khan, A. S., Schad, M., Hacker, J., Liskamp, R. M. et Pieters, R. J. (2003).** Adhesion inhibition of F1C-fimbriated *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa* PAK and PAO by multivalent carbohydrate ligands. *Chembiochem* **4**, 1317-1325.
- Babai, R., Blum-Oehler, G., Stern, B. E., Hacker, J. et Ron, E. Z. (1997).** Virulence patterns from septicemic *Escherichia coli* O78 strains. *FEMS Microbiol Lett* **149**, 99-105.
- Baga, M., Norgren, M. et Normark, S. (1987).** Biogenesis of *E. coli* Pap pili: papH, a minor pilin subunit involved in cell anchoring and length modulation. *Cell* **49**, 241-251.
- Bagg, A. et Neilands, J. B. (1987).** Molecular mechanism of regulation of siderophore-mediated iron assimilation. *Microbiol Rev* **51**, 509-518.
- Bahrani-Mougeot, F. K., Buckles, E. L., Lockatell, C. V., Hebel, J. R., Johnson, D. E., Tang, C. M. et Donnenberg, M. S. (2002).** Type 1 fimbriae and extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol Microbiol* **45**, 1079-1093.
- Barnhart, M. M. et Chapman, M. R. (2006).** Curli biogenesis and function. *Annu Rev Microbiol* **60**, 131-147.
- Barrons, R. et Tassone, D. (2008).** Use of *Lactobacillus* probiotics for bacterial genitourinary infections in women: a review. *Clin Ther* **30**, 453-468.
- Bauer, R. J., Zhang, L., Foxman, B., Siitonen, A., Jantunen, M. E., Saxen, H. et Marrs, C. F. (2002).** Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection-usp, iha, and iroN(*E. coli*). *J Infect Dis* **185**, 1521-1524.
- Benz, I. et Schmidt, M. A. (1989).** Cloning and expression of an adhesin (AIDA-I) involved in diffuse adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **57**, 1506-1511.
- Berg, R. D. (1995).** Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Trends Microbiol* **3**, 149-154.
- Berger, C. N., Billker, O., Meyer, T. F., Servin, A. L. et Kansau, I. (2004).** Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). *Mol Microbiol* **52**, 963-983.
- Beutin, L. (1991).** The different hemolysins of *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* **180**, 167-182.

- Bhakdi, S., Mackman, N., Nicaud, J. M. et Holland, I. B. (1986).** Escherichia coli hemolysin may damage target cell membranes by generating transmembrane pores. *Infect Immun* **52**, 63-69.
- Bhakdi, S., Mackman, N., Menestrina, G., Gray, L., Hugo, F., Seeger, W. et Holland, I. B. (1988).** The hemolysin of Escherichia coli. *Eur J Epidemiol* **4**, 135-143.
- Bilge, S. S., Clausen, C. R., Lau, W. et Moseley, S. L. (1989).** Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated Escherichia coli to HEp-2 cells. *J Bacteriol* **171**, 4281-4289.
- Binns, M. M., Davies, D. L. et Hardy, K. G. (1979).** Cloned fragments of the plasmid ColV,I-K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* **279**, 778-781.
- Binns, M. M., Mayden, J. et Levine, R. P. (1982).** Further characterization of complement resistance conferred on Escherichia coli by the plasmid genes traT of R100 and iss of ColV,I-K94. *Infect Immun* **35**, 654-659.
- Bister, B., Bischoff, D., Nicholson, G. J., Valdebenito, M., Schneider, K., Winkelmann, G., Hantke, K. et Sussmuth, R. D. (2004).** The structure of salmochelins: C-glucosylated enterobactins of Salmonella enterica. *Biometals* **17**, 471-481.
- Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A. et Blanco, J. (1997).** Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by Escherichia coli strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity. *J Clin Microbiol* **35**, 2953-2957.
- Bliss, J. M., Garon, C. F. et Silver, R. P. (1996).** Polysialic acid export in Escherichia coli K1: the role of KpsT, the ATP-binding component of an ABC transporter, in chain translocation. *Glycobiology* **6**, 445-452.
- Boehm, D. F., Welch, R. A. et Snyder, I. S. (1990).** Calcium is required for binding of Escherichia coli hemolysin (HlyA) to erythrocyte membranes. *Infect Immun* **58**, 1951-1958.
- Bonacorsi, S., Clermont, O., Houdouin, V., Cordevant, C., Brahimi, N., Marecat, A., Tinsley, C., Nassif, X., Lange, M. et Bingen, E. (2003).** Molecular analysis and experimental virulence of French and North American Escherichia coli neonatal meningitis isolates: identification of a new virulent clone. *J Infect Dis* **187**, 1895-1906.
- Bonacorsi, S. et Bingen, E. (2005).** Molecular epidemiology of Escherichia coli causing neonatal meningitis. *Int J Med Microbiol* **295**, 373-381.
- Bosman, A. W., Janssen, H. M. et Meijer, E. W. (1999).** About Dendrimers: Structure, Physical Properties, and Applications. *Chem Rev* **99**, 1665-1688.

**Boyd, E. F. et Hartl, D. L. (1998).** Chromosomal regions specific to pathogenic isolates of *Escherichia coli* have a phylogenetically clustered distribution. *J Bacteriol* **180**, 1159-1165.

**Braun, V. (1981).** *Escherichia coli* cells containing the plasmid ColV produce the iron ionophore aerobactin. *FEMS Microbiol Lett* **11**, 225-228.

**Brauner, A., Leissner, M., Wretling, B., Julander, I., Svenson, S. B. et Kallenius, G. (1985).** Occurrence of P-fimbriated *Escherichia coli* in patients with bacteremia. *Eur J Clin Microbiol* **4**, 566-569.

**Brumfitt, W., Hamilton-Miller, J. M., Gargan, R. A., Cooper, J. et Smith, G. W. (1983).** Long-term prophylaxis of urinary infections in women: comparative trial of trimethoprim, methenamine hippurate and topical povidone-iodine. *J Urol* **130**, 1110-1114.

**Capitani, G., Eidam, O., Glockshuber, R. et Grutter, M. G. (2006).** Structural and functional insights into the assembly of type 1 pili from *Escherichia coli*. *Microbes Infect* **8**, 2284-2290.

**Caprioli, A., Falbo, V., Roda, L. G., Ruggeri, F. M. et Zona, C. (1983).** Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* **39**, 1300-1306.

**Caza, M., Lepine, F., Milot, S. et Dozois, C. M. (2008).** Specific roles of the *iroBCDEN* genes in virulence of an avian pathogenic *Escherichia coli* O78 strain and in production of salmochelins. *Infect Immun* **76**, 3539-3549.

**Choudhury, D., Thompson, A., Stojanoff, V., Langermann, S., Pinkner, J., Hultgren, S. J. et Knight, S. D. (1999).** X-ray structure of the FimC-FimH chaperone-adhesin complex from uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **285**, 1061-1066.

**Chu, D. et Blomfield, I. C. (2006).** Orientational control is an efficient control mechanism for phase switching in the *E. coli* *fim* system. *J Theor Biol* **244**, 541-551.

**Chu, D. (2009).** Modes of evolution in a parasite-host interaction: dis-entangling factors determining the evolution of regulated fimbriation in *E. coli*. *Biosystems* **95**, 67-74.

**Clancy, J. et Savage, D. C. (1981).** Another Colicin V phenotype: in vitro adhesion of *Escherichia coli* to mouse intestinal epithelium. *Infect Immun* **32**, 343-352.

**Claret, L., Miquel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D. A., Gomelsky, M. et Darfeuille-Michaud, A. (2007).** The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn disease-associated *Escherichia coli* via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway. *J Biol Chem* **282**, 33275-33283.

- Clermont, O., Bonacorsi, S. et Bingen, E. (2000).** Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* **66**, 4555-4558.
- Colgan, R., Nicolle, L. E., McGlone, A. et Hooton, T. M. (2006).** Asymptomatic bacteriuria in adults. *Am Fam Physician* **74**, 985-990.
- Connell, I., Agace, W., Klemm, P., Schembri, M., Marild, S. et Svanborg, C. (1996).** Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 9827-9832.
- Cortes, M. A., Gibon, J., Chanteloup, N. K., Moulin-Schouleur, M., Gilot, P. et Germon, P. (2008).** Inactivation of *ibeA* and *ibeT* results in decreased expression of type 1 fimbriae in extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strain BEN2908. *Infect Immun* **76**, 4129-4136.
- Cox, F. (1982).** Prevention of group B streptococcal colonization with topically applied lipoteichoic acid in a maternal-newborn mouse model. *Pediatr Res* **16**, 816-819.
- Crepin, S., Lamarche, M. G., Garneau, P., Seguin, J., Proulx, J., Dozois, C. M. et Harel, J. (2008).** Genome-wide transcriptional response of an avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) *pst* mutant. *BMC Genomics* **9**, 568.
- Crosa, J. H. et Walsh, C. T. (2002).** Genetics and assembly line enzymology of siderophore biosynthesis in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**, 223-249.
- Dale, J. B., Baird, R. W., Courtney, H. S., Hasty, D. L. et Bronze, M. S. (1994).** Passive protection of mice against group A streptococcal pharyngeal infection by lipoteichoic acid. *J Infect Dis* **169**, 319-323.
- Datsenko, K. A. et 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.
- de Lorenzo, V. et Martinez, J. L. (1988).** Aerobactin production as a virulence factor: a reevaluation. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**, 621-629.
- de Louvois, J., Blackbourn, J., Hurley, R. et Harvey, D. (1991).** Infantile meningitis in England and Wales: a two year study. *Arch Dis Child* **66**, 603-607.
- de Man, P., Jodal, U., Lincoln, K. et Eden, C. S. (1988).** Bacterial attachment and inflammation in the urinary tract. *J Infect Dis* **158**, 29-35.
- Dho-Moulin, M. et Fairbrother, J. M. (1999).** Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Vet Res* **30**, 299-316.
- Di Martino, P., Agniel, R., David, K., Templer, C., Gaillard, J. L., Denys, P. et Botto, H. (2006).** Reduction of *Escherichia coli* adherence to uroepithelial bladder cells after

consumption of cranberry juice: a double-blind randomized placebo-controlled cross-over trial. *World J Urol* **24**, 21-27.

**Dobrindt, U. (2005).** (Patho-)Genomics of *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**, 357-371.

**Dozois, C. M., Fairbrother, J. M., Harel, J. et Bosse, M. (1992).** pap-and pil-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infect Immun* **60**, 2648-2656.

**Dozois, C. M., Chanteloup, N., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C. et Fairbrother, J. M. (1994).** Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Dis* **38**, 231-239.

**Dozois, C. M., Pourbakhsh, S. A. et Fairbrother, J. M. (1995).** Expression of P and type 1 (F1) fimbriae in pathogenic *Escherichia coli* from poultry. *Vet Microbiol* **45**, 297-309.

**Dozois, C. M. et Curtiss, R., 3rd (1999).** Pathogenic diversity of *Escherichia coli* and the emergence of 'exotic' islands in the gene stream. *Vet Res* **30**, 157-179.

**Dozois, C. M., Dho-Moulin, M., Bree, A., Fairbrother, J. M., Desautels, C. et Curtiss, R., 3rd (2000).** Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the Tsh genetic region. *Infect Immun* **68**, 4145-4154.

**Dozois, C. M., Daigle, F. et Curtiss, R., 3rd (2003).** Identification of pathogen-specific and conserved genes expressed in vivo by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 247-252.

**Eden, C. S., Freter, R., Hagberg, L., Hull, R., Hull, S., Leffler, H. et Schoolnik, G. (1982).** Inhibition of experimental ascending urinary tract infection by an epithelial cell-surface receptor analogue. *Nature* **298**, 560-562.

**Ewers, C., Li, G., Wilking, H., Kiessling, S., Alt, K., Antao, E. M., Laturus, C., Diehl, I., Glodde, S., Homeier, T., Bohnke, U., Steinruck, H., Philipp, H. C. et Wieler, L. H. (2007).** Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol* **297**, 163-176.

**Fader, R. C. et Davis, C. P. (1980).** Effect of piliation on *Klebsiella pneumoniae* infection in rat bladders. *Infect Immun* **30**, 554-561.

**Fairbrother, J. M., Nadeau, E. et Gyles, C. L. (2005).** *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. *Anim Health Res Rev* **6**, 17-39.



- Falbo, V., Pace, T., Picci, L., Pizzi, E. et Caprioli, A. (1993).** Isolation and nucleotide sequence of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor 1 of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **61**, 4909-4914.
- Faraldo-Gomez, J. D. et Sansom, M. S. (2003).** Acquisition of siderophores in gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 105-116.
- Farthing, M. J. (2004).** Bugs and the gut: an unstable marriage. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* **18**, 233-239.
- Fihn, S. D., Boyko, E. J., Normand, E. H., Chen, C. L., Grafton, J. R., Hunt, M., Yarbrow, P., Scholes, D. et Stergachis, A. (1996).** Association between use of spermicide-coated condoms and *Escherichia coli* urinary tract infection in young women. *Am J Epidemiol* **144**, 512-520.
- Firon, N., Ashkenazi, S., Mirelman, D., Ofek, I. et Sharon, N. (1987).** Aromatic alpha-glycosides of mannose are powerful inhibitors of the adherence of type 1 fimbriated *Escherichia coli* to yeast and intestinal epithelial cells. *Infect Immun* **55**, 472-476.
- Fischbach, M. A., Lin, H., Zhou, L., Yu, Y., Abergel, R. J., Liu, D. R., Raymond, K. N., Wanner, B. L., Strong, R. K., Walsh, C. T., Aderem, A. et Smith, K. D. (2006).** The pathogen-associated *iroA* gene cluster mediates bacterial evasion of lipocalin 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16502-16507.
- Forstum, U., Holst, E., Larsson, P. G., Vasquez, A., Jakobsson, T. et Mattsby-Baltzer, I. (2005).** Bacterial vaginosis--a microbiological and immunological enigma. *APMIS* **113**, 81-90.
- Foxman, B. et Frerichs, R. R. (1985a).** Epidemiology of urinary tract infection: II. Diet, clothing, and urination habits. *Am J Public Health* **75**, 1314-1317.
- Foxman, B. et Frerichs, R. R. (1985b).** Epidemiology of urinary tract infection: I. Diaphragm use and sexual intercourse. *Am J Public Health* **75**, 1308-1313.
- Foxman, B. (1990).** Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors. *Am J Public Health* **80**, 331-333.
- Foxman, B., Zhang, L., Tallman, P., Palin, K., Rode, C., Bloch, C., Gillespie, B. et Marrs, C. F. (1995).** Virulence characteristics of *Escherichia coli* causing first urinary tract infection predict risk of second infection. *J Infect Dis* **172**, 1536-1541.
- Foxman, B., Barlow, R., D'Arcy, H., Gillespie, B. et Sobel, J. D. (2000).** Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* **10**, 509-515.
- Foxman, B. (2002).** Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am J Med* **113 Suppl 1A**, 5S-13S.

- Freter, R., O'Brien, P. C. et Macsai, M. S. (1981).** Role of chemotaxis in the association of motile bacteria with intestinal mucosa: in vivo studies. *Infect Immun* **34**, 234-240.
- Gally, D. L., Bogan, J. A., Eisenstein, B. I. et Blomfield, I. C. (1993).** Environmental regulation of the fim switch controlling type 1 fimbrial phase variation in *Escherichia coli* K-12: effects of temperature and media. *J Bacteriol* **175**, 6186-6193.
- Gally, D. L., Leathart, J. et Blomfield, I. C. (1996).** Interaction of FimB and FimE with the fim switch that controls the phase variation of type 1 fimbriae in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **21**, 725-738.
- Gay, C. C. (1965).** *Escherichia Coli* and Neonatal Disease of Calves. *Bacteriol Rev* **29**, 75-101.
- Glode, M. P., Sutton, A., Moxon, E. R. et Robbins, J. B. (1977).** Pathogenesis of neonatal *Escherichia coli* meningitis: induction of bacteremia and meningitis in infant rats fed *E. coli* K1. *Infect Immun* **16**, 75-80.
- Goetz, D. H., Holmes, M. A., Borregaard, N., Bluhm, M. E., Raymond, K. N. et Strong, R. K. (2002).** The neutrophil lipocalin NGAL is a bacteriostatic agent that interferes with siderophore-mediated iron acquisition. *Mol Cell* **10**, 1033-1043.
- Goldman, R. C., Joiner, K. et Leive, L. (1984).** Serum-resistant mutants of *Escherichia coli* O111 contain increased lipopolysaccharide, lack an O antigen-containing capsule, and cover more of their lipid A core with O antigen. *J Bacteriol* **159**, 877-882.
- Goluszko, P., Popov, V., Selvarangan, R., Nowicki, S., Pham, T. et Nowicki, B. J. (1997).** Dr fimbriae operon of uropathogenic *Escherichia coli* mediate microtubule-dependent invasion to the HeLa epithelial cell line. *J Infect Dis* **176**, 158-167.
- Gophna, U., Barlev, M., Seiffers, R., Oelschlager, T. A., Hacker, J. et Ron, E. Z. (2001).** Curli fibers mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells. *Infect Immun* **69**, 2659-2665.
- Gouin, S., Wellens, A., Bouckaert, J. et Kovensky, J. (2009).** Synthetic Multimeric Heptyl Mannosides as Potent Antiadhesives of Uropathogenic *Escherichia coli*. *ChemMedChem* **4**, 749-755.
- Gross, W. G. (1994).** Diseases Due to *Escherichia coli* in Poultry. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 237-259. Edited by C. L. Gyles. Wallingford: CAB International.
- Gupta, K., Hooton, T. M., Roberts, P. L. et Stamm, W. E. (2001).** Patient-initiated treatment of uncomplicated recurrent urinary tract infections in young women. *Ann Intern Med* **135**, 9-16.

- Gupta, K. (2003).** Addressing antibiotic resistance. *Dis Mon* **49**, 99-110.
- Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P. et Mobley, H. L. (2000).** Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **38**, 53-66.
- Guyer, D. M., Radulovic, S., Jones, F. E. et Mobley, H. L. (2002).** Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is a vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infect Immun* **70**, 4539-4546.
- Hacker, J. (1990).** Genetic determinants coding for fimbriae and adhesins of extraintestinal *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol* **151**, 1-27.
- Hacker, J. et Kaper, J. B. (2000).** Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annu Rev Microbiol* **54**, 641-679.
- Hagberg, L., Engberg, I., Freter, R., Lam, J., Olling, S. et Svanborg Eden, C. (1983).** Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect Immun* **40**, 273-283.
- Hahn, E., Wild, P., Hermanns, U., Sebbel, P., Glockshuber, R., Haner, M., Taschner, N., Burkhard, P., Aebi, U. et Muller, S. A. (2002).** Exploring the 3D molecular architecture of *Escherichia coli* type 1 pili. *J Mol Biol* **323**, 845-857.
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsen, A. et Normark, S. (1995).** Expression of two *csg* operons is required for production of fibronectin- and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **18**, 661-670.
- Hammar, M., Bian, Z. et Normark, S. (1996).** Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 6562-6566.
- Hansen, H. C., Haataja, S., Finne, J. et Magnusson, G. (1997).** Di-, tri-, and tetravalent dendritic galabiosides that inhibit hemagglutination by *Streptococcus suis* at nanomolar concentration. *J Am Chem Soc* **119**, 6974-6979.
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W. et Winkelmann, G. (2003).** Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 3677-3682.
- Harris, W. R., Carrano, C. J., Cooper, S. R., Sofen, S. R., Avdeef, A. E., McArdle, J. V. et Raymond, K. N. (1979).** Coordination Chemistry of Microbial Iron Transport Compounds. 19. Stability Constants and Electrochemical Behavior of Ferric Enterobactin and Model Complexes. *J Am Chem Soc* **101**, 6097-6104.

- Heimer, S. R., Rasko, D. A., Lockett, C. V., Johnson, D. E. et Mobley, H. L. (2004).** Autotransporter genes *pic* and *tsh* are associated with *Escherichia coli* strains that cause acute pyelonephritis and are expressed during urinary tract infection. *Infect Immun* **72**, 593-597.
- Henderson, I. R., Owen, P. et Nataro, J. P. (1999).** Molecular switches--the ON and OFF of bacterial phase variation. *Mol Microbiol* **33**, 919-932.
- Henderson, I. R., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R. C. et Ala'Aldeen, D. (2004).** Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**, 692-744.
- Herzer, P. J., Inouye, S., Inouye, M. et Whittam, T. S. (1990).** Phylogenetic distribution of branched RNA-linked multicopy single-stranded DNA among natural isolates of *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **172**, 6175-6181.
- Hodgson, J. C. (1994).** Diseases Due to *Escherichia coli* in Sheep. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 135-150. Edited by C. L. Gyles. Wallingford: CAB International.
- Holden, N. J. et Gally, D. L. (2004).** Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *J Med Microbiol* **53**, 585-593.
- Hristeva, L., Booy, R., Bowler, I. et Wilkinson, A. R. (1993).** Prospective surveillance of neonatal meningitis. *Arch Dis Child* **69**, 14-18.
- Hughes, C., Phillips, R. et Roberts, A. P. (1982).** Serum resistance among *Escherichia coli* strains causing urinary tract infection in relation to O type and the carriage of hemolysin, colicin, and antibiotic resistance determinants. *Infect Immun* **35**, 270-275.
- Hull, R. A., Gill, R. E., Hsu, P., Minshew, B. H. et Falkow, S. (1981).** Construction and expression of recombinant plasmids encoding type 1 or D-mannose-resistant pili from a urinary tract infection *Escherichia coli* isolate. *Infect Immun* **33**, 933-938.
- Hung, C. S., Bouckaert, J., Hung, D., Pinkner, J., Widberg, C., DeFusco, A., Augustine, C. G., Strouse, R., Langermann, S., Waksman, G. et Hultgren, S. J. (2002).** Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol Microbiol* **44**, 903-915.
- Idanpaan-Heikkila, I., Simon, P. M., Zopf, D., Vullo, T., Cahill, P., Sokol, K. et Tuomanen, E. (1997).** Oligosaccharides interfere with the establishment and progression of experimental pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis* **176**, 704-712.
- Ideses, D., Biran, D., Gophna, U., Levy-Nissenbaum, O. et Ron, E. Z. (2005).** The *lpf* operon of invasive *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**, 227-236.

- Jaureguy, F., Landraud, L., Passet, V., Diancourt, L., Frapy, E., Guigon, G., Carbonnelle, E., Lortholary, O., Clermont, O., Denamur, E., Picard, B., Nassif, X. et Brisse, S. (2008).** Phylogenetic and genomic diversity of human bacteremic *Escherichia coli* strains. *BMC Genomics* **9**, 560.
- Johnson, J. R. (1991).** Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* **4**, 80-128.
- Johnson, J. R., Russo, T. A., Tarr, P. I., Carlino, U., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jr. et Stell, A. L. (2000).** Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN*(*E. coli*), among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infect Immun* **68**, 3040-3047.
- Johnson, J. R. et Stell, A. L. (2000).** Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis* **181**, 261-272.
- Johnson, J. R., Delavari, P., Kuskowski, M. et Stell, A. L. (2001a).** Phylogenetic distribution of extraintestinal virulence-associated traits in *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **183**, 78-88.
- Johnson, J. R., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M. et Maslow, J. N. (2001b).** Ongoing horizontal and vertical transmission of virulence genes and *papA* alleles among *Escherichia coli* blood isolates from patients with diverse-source bacteremia. *Infect Immun* **69**, 5363-5374.
- Johnson, J. R., Oswald, E., O'Bryan, T. T., Kuskowski, M. A. et Spanjaard, L. (2002).** Phylogenetic distribution of virulence-associated genes among *Escherichia coli* isolates associated with neonatal bacterial meningitis in the Netherlands. *J Infect Dis* **185**, 774-784.
- Johnson, J. R. et Russo, T. A. (2002).** Uropathogenic *Escherichia coli* as agents of diverse non-urinary tract extraintestinal infections. *J Infect Dis* **186**, 859-864.
- Johnson, J. R., Jelacic, S., Schoening, L. M., Clabots, C., Shaikh, N., Mobley, H. L. et Tarr, P. I. (2005).** The *IrgA* homologue adhesin *Iha* is an *Escherichia coli* virulence factor in murine urinary tract infection. *Infect Immun* **73**, 965-971.
- Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Johnson, S. J., Stell, A. L., Doetkott, C., Johnson, J. R., Kim, K. S., Spanjaard, L. et Nolan, L. K. (2008).** Comparison of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains from human and avian sources reveals a mixed subset representing potential zoonotic pathogens. *Appl Environ Microbiol* **74**, 7043-7050.
- Jones, C. H., Pinkner, J. S., Nicholes, A. V., Slonim, L. N., Abraham, S. N. et Hultgren, S. J. (1993).** *FimC* is a periplasmic *PapD*-like chaperone that directs assembly of type 1 pili in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 8397-8401.

**Jones, C. H., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Nicholes, A. V., Abraham, S. N. et Hultgren, S. J. (1995).** FimH adhesin of type 1 pili is assembled into a fibrillar tip structure in the Enterobacteriaceae. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 2081-2085.

**Justice, S. S., Hung, C., Theriot, J. A., Fletcher, D. A., Anderson, G. G., Footer, M. J. et Hultgren, S. J. (2004).** Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 1333-1338.

**Kaper, J. B., Nataro, J. P. et Mobley, H. L. (2004).** Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* **2**, 123-140.

**Karlowsky, J. A., Kelly, L. J., Thornsberry, C., Jones, M. E. et Sahm, D. F. (2002).** Trends in antimicrobial resistance among urinary tract infection isolates of *Escherichia coli* from female outpatients in the United States. *Antimicrob Agents Chemother* **46**, 2540-2545.

**Kawula, T. H. et Orndorff, P. E. (1991).** Rapid site-specific DNA inversion in *Escherichia coli* mutants lacking the histonelike protein H-NS. *J Bacteriol* **173**, 4116-4123.

**Kelly, C. G., Younson, J. S., Hikmat, B. Y., Todryk, S. M., Czisch, M., Haris, P. I., Flindall, I. R., Newby, C., Mallet, A. I., Ma, J. K. et Lehner, T. (1999).** A synthetic peptide adhesion epitope as a novel antimicrobial agent. *Nat Biotechnol* **17**, 42-47.

**Khan, A. S., Kniep, B., Oelschlaeger, T. A., Van Die, I., Korhonen, T. et Hacker, J. (2000).** Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **68**, 3541-3547.

**Kiessling, L. L., Gestwicki, J. E. et Strong, L. E. (2006).** Synthetic multivalent ligands as probes of signal transduction. *Angew Chem Int Ed Engl* **45**, 2348-2368.

**Kikuchi, T., Mizunoe, Y., Takade, A., Naito, S. et Yoshida, S. (2005).** Curli fibers are required for development of biofilm architecture in *Escherichia coli* K-12 and enhance bacterial adherence to human uroepithelial cells. *Microbiol Immunol* **49**, 875-884.

**Kim, K. J., Elliott, S. J., Di Cello, F., Stins, M. F. et Kim, K. S. (2003).** The K1 capsule modulates trafficking of *E. coli*-containing vacuoles and enhances intracellular bacterial survival in human brain microvascular endothelial cells. *Cell Microbiol* **5**, 245-252.

**Kim, K. S., Itabashi, H., Gemski, P., Sadoff, J., Warren, R. L. et Cross, A. S. (1992).** The K1 capsule is the critical determinant in the development of *Escherichia coli* meningitis in the rat. *J Clin Invest* **90**, 897-905.

**Kim, K. S. (2003).** Pathogenesis of bacterial meningitis: from bacteraemia to neuronal injury. *Nat Rev Neurosci* **4**, 376-385.

**Kitov, P. I., Sadowska, J. M., Mulvey, G., Armstrong, G. D., Ling, H., Pannu, N. S., Read, R. J. et Bundle, D. R. (2000).** Shiga-like toxins are neutralized by tailored multivalent carbohydrate ligands. *Nature* **403**, 669-672.

**Klemm, P. (1984).** The fimA gene encoding the type-1 fimbrial subunit of Escherichia coli. Nucleotide sequence and primary structure of the protein. *Eur J Biochem* **143**, 395-399.

**Klemm, P., Jorgensen, B. J., van Die, I., de Ree, H. et Bergmans, H. (1985).** The fim genes responsible for synthesis of type 1 fimbriae in Escherichia coli, cloning and genetic organization. *Mol Gen Genet* **199**, 410-414.

**Klemm, P. (1986).** Two regulatory fim genes, fimB and fimE, control the phase variation of type 1 fimbriae in Escherichia coli. *Embo J* **5**, 1389-1393.

**Klemm, P. et Christiansen, G. (1987).** Three fim genes required for the regulation of length and mediation of adhesion of Escherichia coli type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet* **208**, 439-445.

**Klemm, P. et Christiansen, G. (1990).** The fimD gene required for cell surface localization of Escherichia coli type 1 fimbriae. *Mol Gen Genet* **220**, 334-338.

**Knight, S. D., Berglund, J. et Choudhury, D. (2000).** Bacterial adhesins: structural studies reveal chaperone function and pilus biogenesis. *Curr Opin Chem Biol* **4**, 653-660.

**Kochan, I., Kvach, J. T. et Wiles, T. I. (1977).** Virulence-associated acquisition of iron in mammalian serum by Escherichia coli. *J Infect Dis* **135**, 623-632.

**Kontiokari, T., Sundqvist, K., Nuutinen, M., Pokka, T., Koskela, M. et Uhari, M. (2001).** Randomised trial of cranberry-lingonberry juice and Lactobacillus GG drink for the prevention of urinary tract infections in women. *BMJ* **322**, 1571.

**Korhonen, T. K., Vaisanen, V., Saxen, H., Hultberg, H. et Svenson, S. B. (1982).** P-antigen-recognizing fimbriae from human uropathogenic Escherichia coli strains. *Infect Immun* **37**, 286-291.

**Korhonen, T. K., Valtonen, M. V., Parkkinen, J., Vaisanen-Rhen, V., Finne, J., Orskov, F., Orskov, I., Svenson, S. B. et Makela, P. H. (1985).** Serotypes, hemolysin production, and receptor recognition of Escherichia coli strains associated with neonatal sepsis and meningitis. *Infect Immun* **48**, 486-491.

**Korhonen, T. K., Parkkinen, J., Hacker, J., Finne, J., Pere, A., Rhen, M. et Holthofer, H. (1986).** Binding of Escherichia coli S fimbriae to human kidney epithelium. *Infect Immun* **54**, 322-327.

- Kostakioti, M. et Stathopoulos, C. (2004).** Functional analysis of the Tsh autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **72**, 5548-5554.
- Koster, W. (2001).** ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res Microbiol* **152**, 291-301.
- Kulasekara, H. D. et Blomfield, I. C. (1999).** The molecular basis for the specificity of fimE in the phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol* **31**, 1171-1181.
- La Ragione, R. M., Collighan, R. J. et Woodward, M. J. (1999).** Non-curling of *Escherichia coli* O78:K80 isolates associated with IS1 insertion in csgB and reduced persistence in poultry infection. *FEMS Microbiol Lett* **175**, 247-253.
- La Ragione, R. M., Sayers, A. R. et Woodward, M. J. (2000).** The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiol Infect* **124**, 351-363.
- La Ragione, R. M. et Woodward, M. J. (2002).** Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Res Vet Sci* **73**, 27-35.
- Lafont, J. P., Dho, M., D'Hauteville, H. M., Bree, A. et Sansonetti, P. J. (1987).** Presence and expression of aerobactin genes in virulent avian strains of *Escherichia coli*. *Infect Immun* **55**, 193-197.
- Landraud, L., Gauthier, M., Fosse, T. et Boquet, P. (2000).** Frequency of *Escherichia coli* strains producing the cytotoxic necrotizing factor (CNF1) in nosocomial urinary tract infections. *Lett Appl Microbiol* **30**, 213-216.
- Lane, M. C., Lockatell, V., Monterosso, G., Lamphier, D., Weinert, J., Hebel, J. R., Johnson, D. E. et Mobley, H. L. (2005).** Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infect Immun* **73**, 7644-7656.
- Lane, M. C., Alteri, C. J., Smith, S. N. et Mobley, H. L. (2007).** Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**, 16669-16674.
- Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J. S., Burlein, J., Barren, P., Koenig, S., Leath, S., Jones, C. H. et Hultgren, S. J. (1997).** Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* **276**, 607-611.
- Langermann, S., Mollby, R., Burlein, J. E., Palaszynski, S. R., Auguste, C. G., DeFusco, A., Strouse, R., Schenerman, M. A., Hultgren, S. J., Pinkner, J. S., Winberg, J., Guldevall, L., Soderhall, M., Ishikawa, K., Normark, S. et Koenig, S.**



(2000). Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* **181**, 774-778.

Langermann, S. et Ballou, W. R., Jr. (2001). Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**, S84-86.

Lasala, F., Arce, E., Otero, J. R., Rojo, J. et Delgado, R. (2003). Mannosyl glycodendritic structure inhibits DC-SIGN-mediated Ebola virus infection in cis and in trans. *Antimicrob Agents Chemother* **47**, 3970-3972.

Le Bouguenec, C. (2005). Adhesins and invasins of pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol* **295**, 471-478.

Leffler, H. et Svanborg-Edén, C. (1980). Chemical Identification of a Glycosphingolipid Receptor for *Escherichia coli* Attaching to Human Urinary Tract Epithelial Cells and Agglutinating Human Erythrocytes. *FEMS Microbiol Lett* **8**, 127-138.

Lemonnier, M., Landraud, L. et Lemichez, E. (2007). Rho GTPase-activating bacterial toxins: from bacterial virulence regulation to eukaryotic cell biology. *FEMS Microbiol Rev* **31**, 515-534.

Leveille, S., Caza, M., Johnson, J. R., Clabots, C., Sabri, M. et Dozois, C. M. (2006). Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed in vivo in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infect Immun* **74**, 3427-3436.

Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R. et Walsh, C. T. (2005). In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *J Am Chem Soc* **127**, 11075-11084.

Lindberg, F., Tennent, J. M., Hultgren, S. J., Lund, B. et Normark, S. (1989). PapD, a periplasmic transport protein in P-pilus biogenesis. *J Bacteriol* **171**, 6052-6058.

Lindberg, F. P., Lund, B. et Normark, S. (1984). Genes of pyelonephritogenic *E. coli* required for digalactoside-specific agglutination of human cells. *Embo J* **3**, 1167-1173.

Lindhorst, T. K., Kieburg, C. et Krallmann-Wenzel, U. (1998). Inhibition of the type 1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli* to erythrocytes by multiantennary alpha-mannosyl clusters: the effect of multivalency. *Glycoconj J* **15**, 605-613.

Lindhorst, T. K., Kotter, S., Krallmann-Wenzel, U. et Ehlers, S. (2001). Trivalent  $\alpha$ -D-mannoside clusters as inhibitors of type-1 fimbriae-mediated adhesion of *Escherichia coli*: structural variation and biotinylation. *J Chem Soc, Perkin Trans 1*, 823-831.

**Lior, H. (1994).** Classification of *Escherichia coli*. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 31-72. Edited by C. L. Gyles. Wallingford: CAB International.

**Lund, B., Lindberg, F., Marklund, B. I. et Normark, S. (1987).** The PapG protein is the alpha-D-galactopyranosyl-(1----4)-beta-D-galactopyranose-binding adhesin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 5898-5902.

**Lymberopoulos, M. H., Houle, S., Daigle, F., Leveille, S., Bree, A., Moulin-Schouleur, M., Johnson, J. R. et Dozois, C. M. (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**, 6449-6459.

**Macnab, R. M. (2003).** How bacteria assemble flagella. *Annu Rev Microbiol* **57**, 77-100.

**Maiden, M. C., Bygraves, J. A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D. A., Feavers, I. M., Achtman, M. et Spratt, B. G. (1998).** Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 3140-3145.

**Maloy, S. R., Stewart, V. J. et Taylor, R. K. (1996).** *Genetic analysis of pathogenic bacteria : a laboratory manual*. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

**Mammen, M., Choi, S.-K. et Whitesides, G. M. (1998).** Polyvalent Interactions in Biological Systems: Implications for Design and Use of Multivalent Ligands and Inhibitors. *Angew Chem Int Ed* **37**, 2754-2899.

**Manning, P. A., Beutin, L. et Achtman, M. (1980).** Outer membrane of *Escherichia coli*: properties of the F sex factor traT protein which is involved in surface exclusion. *J Bacteriol* **142**, 285-294.

**Marc, D., Arne, P., Bree, A. et Dho-Moulin, M. (1998).** Colonization ability and pathogenic properties of a fim- mutant of an avian strain of *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **149**, 473-485.

**Maroncle, N. M., Sivick, K. E., Brady, R., Stokes, F. E. et Mobley, H. L. (2006).** Protease activity, secretion, cell entry, cytotoxicity, and cellular targets of secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* **74**, 6124-6134.

**Marre, R., Hacker, J., Henkel, W. et Goebel, W. (1986).** Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infect Immun* **54**, 761-767.

**Marrion, S. F. (1948).** The chemical reactions of pentaerythritol and its derivatives. *Chem Rev* **43**, 149-202.

**Martinez, J. J., Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Pinkner, J. S. et Hultgren, S. J. (2000).** Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *Embo J* **19**, 2803-2812.

**Maurer, J. J., Brown, T. P., Steffens, W. L. et Thayer, S. G. (1998).** The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Dis* **42**, 106-118.

**May, M., Daley, A. J., Donath, S. et Isaacs, D. (2005).** Early onset neonatal meningitis in Australia and New Zealand, 1992-2002. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **90**, F324-327.

**McTaggart, L. A., Rigby, R. C. et Elliott, T. S. (1990).** The pathogenesis of urinary tract infections associated with *Escherichia coli*, *Staphylococcus saprophyticus* and *S. epidermidis*. *J Med Microbiol* **32**, 135-141.

**Medof, M. E., Walter, E. I., Rutgers, J. L., Knowles, D. M. et Nussenzweig, V. (1987).** Identification of the complement decay-accelerating factor (DAF) on epithelium and glandular cells and in body fluids. *J Exp Med* **165**, 848-864.

**Meiland, R., Geerlings, S. E., Langermann, S., Brouwer, E. C., Coenjaerts, F. E. et Hoepelman, A. I. (2004).** Fimch antiserum inhibits the adherence of *Escherichia coli* to cells collected by voided urine specimens of diabetic women. *J Urol* **171**, 1589-1593.

**Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss, R., 3rd, Brown, P. K., Arne, P., Bree, A., Desautels, C. et Fairbrother, J. M. (2003a).** Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infect Immun* **71**, 536-540.

**Mellata, M., Dho-Moulin, M., Dozois, C. M., Curtiss, R., 3rd, Lehoux, B. et Fairbrother, J. M. (2003b).** Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infect Immun* **71**, 494-503.

**Miyazaki, J., Ba-Thein, W., Kumao, T., Obata Yasuoka, M., Akaza, H. et Hayshi, H. (2002).** Type 1, P and S fimbriae, and afimbrial adhesin I are not essential for uropathogenic *Escherichia coli* to adhere to and invade bladder epithelial cells. *FEMS Immunol Med Microbiol* **33**, 23-26.

**Moch, T., Hoschutzky, H., Hacker, J., Kroncke, K. D. et Jann, K. (1987).** Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2,3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 3462-3466.

**Montgomerie, J. Z., Bindereif, A., Neilands, J. B., Kalmanson, G. M. et Guze, L. B. (1984).** Association of hydroxamate siderophore (aerobactin) with *Escherichia coli* isolated from patients with bacteremia. *Infect Immun* **46**, 835-838.

- Morschhauser, J., Hoschutzky, H., Jann, K. et Hacker, J. (1990).** Functional analysis of the sialic acid-binding adhesin SfaS of pathogenic *Escherichia coli* by site-specific mutagenesis. *Infect Immun* **58**, 2133-2138.
- Mulvey, G., Kitov, P. I., Marcato, P., Bundle, D. R. et Armstrong, G. D. (2001a).** Glycan mimicry as a basis for novel anti-infective drugs. *Biochimie* **83**, 841-847.
- Mulvey, M. A., Lopez-Boado, Y. S., Wilson, C. L., Roth, R., Parks, W. C., Heuser, J. et Hultgren, S. J. (1998).** Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **282**, 1494-1497.
- Mulvey, M. A., Schilling, J. D. et Hultgren, S. J. (2001b).** Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* **69**, 4572-4579.
- Mulvey, M. A. (2002).** Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* **4**, 257-271.
- Mysore, J. V., Wigginton, T., Simon, P. M., Zopf, D., Heman-Ackah, L. M. et Dubois, A. (1999).** Treatment of *Helicobacter pylori* infection in rhesus monkeys using a novel antiadhesion compound. *Gastroenterology* **117**, 1316-1325.
- Nataro, J. P. et Levine, M. M. (1994).** *Escherichia coli* Diseases in Humans. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 285-333. Edited by C. L. Gyles. Wallingford: CAB International.
- Nataro, J. P., Yikang, D., Yingkang, D. et Walker, K. (1994).** AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *J Bacteriol* **176**, 4691-4699.
- Nataro, J. P. et Kaper, J. B. (1998).** Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* **11**, 142-201.
- Negre, V. L., Bonacorsi, S., Schubert, S., Bidet, P., Nassif, X. et Bingen, E. (2004).** The siderophore receptor IronN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitis. *Infect Immun* **72**, 1216-1220.
- Nicolle, L. E. (2003).** Urinary tract infection: traditional pharmacologic therapies. *Dis Mon* **49**, 111-128.
- Nicolle, L. E., Bradley, S., Colgan, R., Rice, J. C., Schaeffer, A. et Hooton, T. M. (2005).** Infectious Diseases Society of America guidelines for the diagnosis and treatment of asymptomatic bacteriuria in adults. *Clin Infect Dis* **40**, 643-654.

- Nilius, A. M. et Savage, D. C. (1984).** Serum resistance encoded by colicin V plasmids in *Escherichia coli* and its relationship to the plasmid transfer system. *Infect Immun* **43**, 947-953.
- Noller, A. C., McEllistrem, M. C., Stine, O. C., Morris, J. G., Jr., Boxrud, D. J., Dixon, B. et Harrison, L. H. (2003).** Multilocus sequence typing reveals a lack of diversity among *Escherichia coli* O157:H7 isolates that are distinct by pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **41**, 675-679.
- Nowicki, B., Labigne, A., Moseley, S., Hull, R., Hull, S. et Moulds, J. (1990).** The Dr hemagglutinin, afimbrial adhesins AFA-I and AFA-III, and F1845 fimbriae of uropathogenic and diarrhea-associated *Escherichia coli* belong to a family of hemagglutinins with Dr receptor recognition. *Infect Immun* **58**, 279-281.
- Nowicki, B., Hart, A., Coyne, K. E., Lublin, D. M. et Nowicki, S. (1993).** Short consensus repeat-3 domain of recombinant decay-accelerating factor is recognized by *Escherichia coli* recombinant Dr adhesin in a model of a cell-cell interaction. *J Exp Med* **178**, 2115-2121.
- Nunoya, T., Tajima, M., Izuchi, T., Takahashi, K., Otaki, Y., Nagasawa, Y. et Hakogi, E. (1991).** Pathology of a broiler disease characterized by the swollen head. *J Vet Med Sci* **53**, 347-349.
- O'Brien, I. G., Cox, G. B. et Gibson, F. (1970).** Biologically active compounds containing 2,3-dihydroxybenzoic acid and serine formed by *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta* **201**, 453-460.
- O'Gara J, P. et Dorman, C. J. (2000).** Effects of local transcription and H-NS on inversion of the fim switch of *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **36**, 457-466.
- Ochman, H. et Selander, R. K. (1984).** Standard reference strains of *Escherichia coli* from natural populations. *J Bacteriol* **157**, 690-693.
- Ofek, I., Hasty, D. L. et Doyle, R. J. (2003).** *Bacterial adhesion to animal cells and tissues*. Washington, D.C.: ASM Press.
- Olsen, A., Jonsson, A. et Normark, S. (1989).** Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature* **338**, 652-655.
- Olsen, A., Arnqvist, A., Hammar, M., Sukupolvi, S. et Normark, S. (1993).** The RpoS sigma factor relieves H-NS-mediated transcriptional repression of *csgA*, the subunit gene of fibronectin-binding curli in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **7**, 523-536.
- Ott, M., Hacker, J., Schmoll, T., Jarchau, T., Korhonen, T. K. et Goebel, W. (1986).** Analysis of the genetic determinants coding for the S-fimbrial adhesin (*sfa*) in different *Escherichia coli* strains causing meningitis or urinary tract infections. *Infect Immun* **54**, 646-653.

**Ott, M., Schmoll, T., Goebel, W., Van Die, I. et Hacker, J. (1987).** Comparison of the genetic determinant coding for the S-fimbrial adhesin (sfa) of *Escherichia coli* to other chromosomally encoded fimbrial determinants. *Infect Immun* **55**, 1940-1943.

**Parham, N. J., Pollard, S. J., Desvaux, M., Scott-Tucker, A., Liu, C., Fivian, A. et Henderson, I. R. (2005).** Distribution of the serine protease autotransporters of the Enterobacteriaceae among extraintestinal clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* **43**, 4076-4082.

**Parkkinen, J., Ristimaki, A. et Westerlund, B. (1989).** Binding of *Escherichia coli* S fimbriae to cultured human endothelial cells. *Infect Immun* **57**, 2256-2259.

**Parreira, V. R. et Gyles, C. L. (2003).** A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infect Immun* **71**, 5087-5096.

**Parthasarathy, G., Yao, Y. et Kim, K. S. (2007).** Flagella promote *Escherichia coli* K1 association with and invasion of human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **75**, 2937-2945.

**Peeters, J. E. (1994).** *Escherichia coli* Infections in Rabbits, Cats, Dogs, Goats and Horses. In *Escherichia coli in Domestic Animals and Humans*, pp. 261-283. Edited by C. L. Gyles. Wallingford: CAB International.

**Picard, B., Garcia, J. S., Gouriou, S., Duriez, P., Brahim, N., Bingen, E., Elion, J. et Denamur, E. (1999).** The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infect Immun* **67**, 546-553.

**Pieters, R. J. (2007).** Intervention with bacterial adhesion by multivalent carbohydrates. *Med Res Rev* **27**, 796-816.

**Platt, F. M., Neises, G. R., Karlsson, G. B., Dwek, R. A. et Butters, T. D. (1994).** N-butyldeoxygalactonojirimycin inhibits glycolipid biosynthesis but does not affect N-linked oligosaccharide processing. *J Biol Chem* **269**, 27108-27114.

**Platt, F. M., Reinkensmeier, G., Dwek, R. A. et Butters, T. D. (1997).** Extensive glycosphingolipid depletion in the liver and lymphoid organs of mice treated with N-butyldeoxynojirimycin. *J Biol Chem* **272**, 19365-19372.

**Pluschke, G., Mayden, J., Achtman, M. et Levine, R. P. (1983a).** Role of the capsule and the O antigen in resistance of O18:K1 *Escherichia coli* to complement-mediated killing. *Infect Immun* **42**, 907-913.

**Pluschke, G., Mercer, A., Kusecek, B., Pohl, A. et Achtman, M. (1983b).** Induction of bacteremia in newborn rats by *Escherichia coli* K1 is correlated with only certain O (lipopolysaccharide) antigen types. *Infect Immun* **39**, 599-608.

- Poggio, T. V., La Torre, J. L. et Scodeller, E. A. (2006).** Intranasal immunization with a recombinant truncated FimH adhesin adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against uropathogenic *Escherichia coli* challenge. *Can J Microbiol* **52**, 1093-1102.
- Pollack, J. R. et Neilands, J. B. (1970).** Enterobactin, an iron transport compound from *Salmonella typhimurium*. *Biochem Biophys Res Commun* **38**, 989-992.
- Pourbakhsh, S. A., Boulianne, M., Martineau-Doize, B. et Fairbrother, J. M. (1997a).** Virulence mechanisms of avian fimbriated *Escherichia coli* in experimentally inoculated chickens. *Vet Microbiol* **58**, 195-213.
- Pourbakhsh, S. A., Dho-Moulin, M., Bree, A., Desautels, C., Martineau-Doize, B. et Fairbrother, J. M. (1997b).** Localization of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*. *Microb Pathog* **22**, 331-341.
- Prescott, L. M., Harley, J. P. et Klein, D. A. (2003).** *Microbiologie*, 2e éd. française. edn. Bruxelles: De Boeck.
- Provence, D. L. et Curtiss, R., 3rd (1994).** Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect Immun* **62**, 1369-1380.
- Raz, R. (2003).** Asymptomatic bacteriuria. Clinical significance and management. *Int J Antimicrob Agents* **22 Suppl 2**, 45-47.
- Reid, G. (1999).** Potential preventive strategies and therapies in urinary tract infection. *World J Urol* **17**, 359-363.
- Reid, G., Beuerman, D., Heinemann, C. et Bruce, A. W. (2001).** Probiotic *Lactobacillus* dose required to restore and maintain a normal vaginal flora. *FEMS Immunol Med Microbiol* **32**, 37-41.
- Reid, G. et Bruce, A. W. (2001).** Selection of *Lactobacillus* strains for urogenital probiotic applications. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**, S77-80.
- Reingold, J., Starr, N., Maurer, J. et Lee, M. D. (1999).** Identification of a new *Escherichia coli* She haemolysin homolog in avian *E. coli*. *Vet Microbiol* **66**, 125-134.
- Restieri, C., Garriss, G., Locas, M. C. et Dozois, C. M. (2007).** Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Appl Environ Microbiol* **73**, 1553-1562.
- Riegman, N., Kusters, R., Van Veggel, H., Bergmans, H., Van Bergen en Henegouwen, P., Hacker, J. et Van Die, I. (1990).** F1C fimbriae of a uropathogenic

Escherichia coli strain: genetic and functional organization of the foc gene cluster and identification of minor subunits. *J Bacteriol* **172**, 1114-1120.

**Robins-Browne, R. M. et Hartland, E. L. (2002).** Escherichia coli as a cause of diarrhea. *J Gastroenterol Hepatol* **17**, 467-475.

**Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K. et Nolan, L. K. (2005).** Comparison of Escherichia coli isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. *Microbiology* **151**, 2097-2110.

**Roesch, P. L. et Blomfield, I. C. (1998).** Leucine alters the interaction of the leucine-responsive regulatory protein (Lrp) with the fim switch to stimulate site-specific recombination in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **27**, 751-761.

**Ronald, A. (2003).** The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Dis Mon* **49**, 71-82.

**Roos, V., Nielsen, E. M. et Klemm, P. (2006).** Asymptomatic bacteriuria Escherichia coli strains: adhesins, growth and competition. *FEMS Microbiol Lett* **262**, 22-30.

**Roy, R. (1996).** Syntheses and some applications of chemically defined multivalent glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol* **6**, 692-702.

**Roy, R. (2003).** A decade of glycodendrimer chemistry. *Trends Glycosci Glycotechnol* **15**, 291-310.

**Russo, T. A., Stapleton, A., Wenderoth, S., Hooton, T. M. et Stamm, W. E. (1995).** Chromosomal restriction fragment length polymorphism analysis of Escherichia coli strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J Infect Dis* **172**, 440-445.

**Russo, T. A. et Johnson, J. R. (2000).** Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of Escherichia coli: ExPEC. *J Infect Dis* **181**, 1753-1754.

**Russo, T. A., McFadden, C. D., Carlino-MacDonald, U. B., Beanan, J. M., Barnard, T. J. et Johnson, J. R. (2002).** IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of Escherichia coli. *Infect Immun* **70**, 7156-7160.

**Russo, T. A. et Johnson, J. R. (2003).** Medical and economic impact of extraintestinal infections due to Escherichia coli: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes Infect* **5**, 449-456.

**Ruttgers, H. et Grischke, E. (1987).** Elevation of secretory IgA antibodies in the urinary tract by immunostimulation for the pre-operative treatment and post-operative prevention of urinary tract infections. *Urol Int* **42**, 424-426.



- Salyers, A. A. et Whitt, D. D. (2002).** *Bacterial pathogenesis : a molecular approach*, 2nd edn. Washington, D.C.: ASM Press.
- Saukkonen, K. M., Nowicki, B. et Leinonen, M. (1988).** Role of type 1 and S fimbriae in the pathogenesis of Escherichia coli O18:K1 bacteremia and meningitis in the infant rat. *Infect Immun* **56**, 892-897.
- Saulino, E. T., Bullitt, E. et Hultgren, S. J. (2000).** Snapshots of usher-mediated protein secretion and ordered pilus assembly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 9240-9245.
- Save, S., Mjosberg, J., Poljakovic, M., Mohlin, C. et Persson, K. (2009).** Adenosine receptor expression in Escherichia coli-infected and cytokine-stimulated human urinary tract epithelial cells. *BJU Int*.
- Schaeffer, A. J. (2001).** What do we know about the urinary tract infection-prone individual? *J Infect Dis* **183 Suppl 1**, S66-69.
- Scholes, D., Hooton, T. M., Roberts, P. L., Stapleton, A. E., Gupta, K. et Stamm, W. E. (2000).** Risk factors for recurrent urinary tract infection in young women. *J Infect Dis* **182**, 1177-1182.
- Schwan, W. R., Lee, J. L., Lenard, F. A., Matthews, B. T. et Beck, M. T. (2002).** Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic Escherichia coli. *Infect Immun* **70**, 1391-1402.
- Selander, R. K., Caugant, D. A., Ochman, H., Musser, J. M., Gilmour, M. N. et Whittam, T. S. (1986).** Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl Environ Microbiol* **51**, 873-884.
- Servin, A. L. (2005).** Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering Escherichia coli. *Clin Microbiol Rev* **18**, 264-292.
- Sharon, N. (2006).** Carbohydrates as future anti-adhesion drugs for infectious diseases. *Biochim Biophys Acta* **1760**, 527-537.
- Short, E. C. et Kurtz, H. J. (1971).** Properties of the Hemolytic Activities of Escherichia coli. *Infect Immun* **3**, 678-687.
- Shulman, S. T., Friedmann, H. C. et Sims, R. H. (2007).** Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis* **45**, 1025-1029.
- Siitonen, A., Martikainen, R., Ikaheimo, R., Palmgren, J. et Makela, P. H. (1993).** Virulence-associated characteristics of Escherichia coli in urinary tract infection: a statistical analysis with special attention to type 1C fimbriation. *Microb Pathog* **15**, 65-75.

**Simon, P. M., Goode, P. L., Mobasser, A. et Zopf, D. (1997).** Inhibition of *Helicobacter pylori* binding to gastrointestinal epithelial cells by sialic acid-containing oligosaccharides. *Infect Immun* **65**, 750-757.

**Smith, K. D. (2007).** Iron metabolism at the host pathogen interface: lipocalin 2 and the pathogen-associated *iroA* gene cluster. *Int J Biochem Cell Biol* **39**, 1776-1780.

**Stamm, W. E., Hooton, T. M., Johnson, J. R., Johnson, C., Stapleton, A., Roberts, P. L., Moseley, S. L. et Fihn, S. D. (1989).** Urinary tract infections: from pathogenesis to treatment. *J Infect Dis* **159**, 400-406.

**Stapleton, A., Latham, R. H., Johnson, C. et Stamm, W. E. (1990).** Postcoital antimicrobial prophylaxis for recurrent urinary tract infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *JAMA* **264**, 703-706.

**Stathopoulos, C., Provence, D. L. et Curtiss, R., 3rd (1999).** Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infect Immun* **67**, 772-781.

**Stocki, S. L., Babiuk, L. A., Rawlyk, N. A., Potter, A. A. et Allan, B. J. (2002).** Identification of genomic differences between *Escherichia coli* strains pathogenic for poultry and *E. coli* K-12 MG1655 using suppression subtractive hybridization analysis. *Microb Pathog* **33**, 289-298.

**Stromberg, N., Marklund, B. I., Lund, B., Ilver, D., Hamers, A., Gaastra, W., Karlsson, K. A. et Normark, S. (1990).** Host-specificity of uropathogenic *Escherichia coli* depends on differences in binding specificity to Gal alpha 1-4Gal-containing isoreceptors. *Embo J* **9**, 2001-2010.

**Svensson, M., Platt, F., Frendeus, B., Butters, T., Dwek, R. et Svanborg, C. (2001).** Carbohydrate receptor depletion as an antimicrobial strategy for prevention of urinary tract infection. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**, S70-73.

**Sweet, R. L. (2000).** Gynecologic conditions and bacterial vaginosis: implications for the non-pregnant patient. *Infect Dis Obstet Gynecol* **8**, 184-190.

**Tarr, P. I., Bilge, S. S., Vary, J. C., Jr., Jelacic, S., Habeeb, R. L., Ward, T. R., Baylor, M. R. et Besser, T. E. (2000).** Iha: a novel *Escherichia coli* O157:H7 adherence-conferring molecule encoded on a recently acquired chromosomal island of conserved structure. *Infect Immun* **68**, 1400-1407.

**Taylor, P. W. (1983).** Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol Rev* **47**, 46-83.

**Teng, C. H., Cai, M., Shin, S., Xie, Y., Kim, K. J., Khan, N. A., Di Cello, F. et Kim, K. S. (2005).** *Escherichia coli* K1 RS218 interacts with human brain microvascular

endothelial cells via type 1 fimbria bacteria in the fimbriated state. *Infect Immun* **73**, 2923-2931.

**Teng, C. H., Xie, Y., Shin, S., Di Cello, F., Paul-Satyaseela, M., Cai, M. et Kim, K. S. (2006).** Effects of ompA deletion on expression of type 1 fimbriae in Escherichia coli K1 strain RS218 and on the association of E. coli with human brain microvascular endothelial cells. *Infect Immun* **74**, 5609-5616.

**Touaibia, M. et Roy, R. (2007).** Glycodendrimers as anti-adhesion drugs against type 1 fimbriated E. coli uropathogenic infections. *Mini Rev Med Chem* **7**, 1270-1283.

**Touaibia, M. et Roy, R. (2008).** First Synthesis of "Majoral-Type" Glycodendrimers Bearing Covalently Bound alpha-d-Mannopyranoside Residues onto a Hexachlocyclotriphosphazene Core. *J Org Chem*.

**Tully, B. T., Li, M., Sun, Y., Berkowitz, J. et Chai, T. C. (2009).** Defects in muscarinic receptor cell signaling in bladder urothelial cancer cell lines. *Urology* **74**, 467-473.

**Uehling, D. T., Hopkins, W. J. et Balish, E. (1990).** Decreased immunologic responsiveness following intensified vaginal immunization against urinary tract infection. *J Urol* **143**, 143-145.

**Ulleryd, P. (2003).** Febrile urinary tract infection in men. *Int J Antimicrob Agents* **22 Suppl 2**, 89-93.

**Unhanand, M., Mustafa, M. M., McCracken, G. H., Jr. et Nelson, J. D. (1993).** Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. *J Pediatr* **122**, 15-21.

**Valenski, M. L., Harris, S. L., Spears, P. A., Horton, J. R. et Orndorff, P. E. (2003).** The Product of the fimI gene is necessary for Escherichia coli type 1 pilus biosynthesis. *J Bacteriol* **185**, 5007-5011.

**Valvano, M. A. et Crosa, J. H. (1984).** 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* **46**, 159-167.

**van den Bosch, J. F., Hendriks, J. H., Gladigau, I., Willems, H. M., Storm, P. K. et de Graaf, F. K. (1993).** Identification of F11 fimbriae on chicken Escherichia coli strains. *Infect Immun* **61**, 800-806.

**van der Woude, M. W. et Baumler, A. J. (2004).** Phase and antigenic variation in bacteria. *Clin Microbiol Rev* **17**, 581-611, table of contents.

**van der Woude, M. W. (2006).** Re-examining the role and random nature of phase variation. *FEMS Microbiol Lett* **254**, 190-197.

- Van Dijk, W. C., Verbrugh, H. A., van der Tol, M. E., Peters, R. et Verhoef, J. (1979).** Role of Escherichia coli K capsular antigens during complement activation, C3 fixation, and opsonization. *Infect Immun* **25**, 603-609.
- Velraeds, M. M., van der Mei, H. C., Reid, G. et Busscher, H. J. (1996).** Inhibition of initial adhesion of uropathogenic Enterococcus faecalis by biosurfactants from Lactobacillus isolates. *Appl Environ Microbiol* **62**, 1958-1963.
- Vetsch, M., Puorger, C., Spirig, T., Grauschopf, U., Weber-Ban, E. U. et Glockshuber, R. (2004).** Pilus chaperones represent a new type of protein-folding catalyst. *Nature* **431**, 329-333.
- Virkola, R., Westerlund, B., Holthofer, H., Parkkinen, J., Kekomaki, M. et Korhonen, T. K. (1988).** Binding characteristics of Escherichia coli adhesins in human urinary bladder. *Infect Immun* **56**, 2615-2622.
- Waters, V. L. et Crosa, J. H. (1991).** Colicin V virulence plasmids. *Microbiol Rev* **55**, 437-450.
- Westerlund, B., Kuusela, P., Risteli, J., Risteli, L., Vartio, T., Rauvala, H., Virkola, R. et Korhonen, T. K. (1989).** The O75X adhesin of uropathogenic Escherichia coli is a type IV collagen-binding protein. *Mol Microbiol* **3**, 329-337.
- White, D. G., Dho-Moulin, M., Wilson, R. A. et Whittam, T. S. (1993).** Clonal relationships and variation in virulence among Escherichia coli strains of avian origin. *Microb Pathog* **14**, 399-409.
- Whitfield, C. et Roberts, I. S. (1999).** Structure, assembly and regulation of expression of capsules in Escherichia coli. *Mol Microbiol* **31**, 1307-1319.
- Whittam, T. S., Ochman, H. et Selander, R. K. (1983).** Multilocus genetic structure in natural populations of Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**, 1751-1755.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R. et Mulvey, M. A. (2008).** Origins and virulence mechanisms of uropathogenic Escherichia coli. *Exp Mol Pathol* **85**, 11-19.
- Williams, P. H. et Warner, P. J. (1980).** ColV plasmid-mediated, colicin V-independent iron uptake system of invasive strains of Escherichia coli. *Infect Immun* **29**, 411-416.
- Williams, P. H. et Carbonetti, N. H. (1986).** Iron, siderophores, and the pursuit of virulence: independence of the aerobactin and enterochelin iron uptake systems in Escherichia coli. *Infect Immun* **51**, 942-947.
- Wright, K. J., Seed, P. C. et Hultgren, S. J. (2005).** Uropathogenic Escherichia coli flagella aid in efficient urinary tract colonization. *Infect Immun* **73**, 7657-7668.

**Wright, K. J. et Hultgren, S. J. (2006).** Sticky fibers and uropathogenesis: bacterial adhesins in the urinary tract. *Future Microbiol* **1**, 75-87.

**Wright, K. J., Seed, P. C. et Hultgren, S. J. (2007).** Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cell Microbiol* **9**, 2230-2241.

**Wullt, B., Bergsten, G., Samuelsson, M., Gebretsadik, N., Hull, R. et Svanborg, C. (2001).** The role of P fimbriae for colonization and host response induction in the human urinary tract. *J Infect Dis* **183 Suppl 1**, S43-46.

**Xie, J., Foxman, B., Zhang, L. et Marrs, C. F. (2006).** Molecular epidemiologic identification of *Escherichia coli* genes that are potentially involved in movement of the organism from the intestinal tract to the vagina and bladder. *J Clin Microbiol* **44**, 2434-2441.

**Xie, Y., Kim, K. J. et Kim, K. S. (2004).** Current concepts on *Escherichia coli* K1 translocation of the blood-brain barrier. *FEMS Immunol Med Microbiol* **42**, 271-279.

**Yerushalmi, Z., Smorodinsky, N. I., Naveh, M. W. et Ron, E. Z. (1990).** Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. *Infect Immun* **58**, 1129-1131.

**Zdziarski, J., Svanborg, C., Wullt, B., Hacker, J. et Dobrindt, U. (2008).** Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation? *Infect Immun* **76**, 695-703.

**Zhang, L., Foxman, B. et Marrs, C. (2002).** Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *J Clin Microbiol* **40**, 3951-3955.

**Zhou, G., Mo, W. J., Sebbel, P., Min, G., Neubert, T. A., Glockshuber, R., Wu, X. R., Sun, T. T. et Kong, X. P. (2001).** Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J Cell Sci* **114**, 4095-4103.

**Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M. et Romling, U. (2003).** Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family Enterobacteriaceae isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun* **71**, 4151-4158.

